

Année 1965

N° d'ordre : 132

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

PAR

Eliane FAUROT-BOUCHET

PREMIÈRE THÈSE

**Composition de la cire
de *Gascardia madagascariensis*
et autres cochenilles**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 13 Mars 1965, devant la Commission d'Examen.

M. J. CHOPIN..... Président

M^{lle} D. GAUTHERON }
M. G. MICHEL } Membres du Jury

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1965

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

PAR

Eliane FAUROT-BOUCHET

PREMIÈRE THÈSE

**Composition de la cire
de *Gascardia madagascariensis*
et autres cochenilles**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 13 Mars 1965, devant la Commission d'Examen.

M. J. CHOPIN.....	Président
M ^{lle} D. GAUTHERON	} Membres du Jury
M. G. MICHEL	

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1965





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553406_0017

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE DES SCIENCES

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, DOUIN, EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD, BOIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTE	Chimie industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie générale II
COLONGE	Chimie organique
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
DUFAY Jean	Astronomie
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHNER	Chimie industrielle
PAVANS DE CECCATTY	Zoologie
MERLIN	Chimie analytique
DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
LUBET	Physiologie
PHILBERT	Physique nucléaire
COHEN-ADAD	Chimie
DAVID Louis	Géologie générale
CHANEL	Psychophysiologie
MAURY	Méthodes Mathématiques de la Physique

MM. DEPRAZ	Physique nucléaire
GAUTHIER Jean	Chimie
GAUME	Physique expérimentale

Professeurs sans chaire

MM. FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
LEGAY	Zoologie expérimentale S.P.C.N.
UZAN	Physique S.P.C.N.
CHENEVOY	Géologie appliquée
GINET	Zoologie
ASCH	Physique
MICHEL Pierre	Minéralogie
DUCET	Biologie végétale
Mlle MAITROT	Physique
GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
d'INCAN	Physique
LEFEBVRE	Mathématiques
PERNET	Mathématiques
CHERY	Physique
BERGEON	Physique C.S.U.
Mlle GAUTHERON	Chimie biologique

Maîtres de Conférences

Mme ERICSON	Physique générale
MM. MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des Fluides
ERBEIA	Physique
DESCOTES	Chimie organique
PICARD Philippe	Mathématiques
LEMOIGNE	Botanique
DEMARCO	Géologie générale
MICHEL Georges	Biochimie
LEBRETON	Biologie végétale
DAVID Jean	Biologie animale
TOUSSET	Chimie propédeutique
FEUVRAIS	Physique Electricité
PICARD Claude	Mathématiques
SCHMITT	Physique M.P.C.
LAURENT	Chimie organique
ROT	Mathématiques
BETHOUX	Mathématiques T.M.P.
Mlle CALAIS	Mathématiques C.S.U.
GUSAKOW	Physique
Mlle THOMAS	Chimie minérale

Maître de Conférences adjoint

M. PIERRON	Chimie
------------	--------

Conseiller Administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal Honoraire

M. ROUX

A Monsieur G. M I C H E L

Maître de Conférences à la

Faculté des Sciences de Lyon.

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté Catholique des Sciences de Lyon sous la direction de Monsieur le Professeur G. MICHEL. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour son initiation à la recherche et pour les conseils éclairés et l'aide constante qu'il m'a apportés au cours de mon travail.

Je remercie Monsieur le Professeur J. CHOPIN d'avoir accepté de présider mon jury.

Je désire aussi adresser mes remerciements à Mademoiselle D. GAUTHERON, Professeur à la Faculté des Sciences, qui a bien voulu faire partie de mon jury.

Je prie Monsieur H. LORA, directeur de Synchroné, d'accepter mes plus vifs remerciements pour les cocons de *Gascardia Madagascariensis* qu'il m'a toujours très aimablement fournis.

Je tiens enfin à exprimer ma gratitude à mes camarades de laboratoire pour l'aide qu'elles m'ont apportée au cours de mes recherches.

INTRODUCTION

Les cochenilles sont des insectes extrêmement répandus dans la nature, il en existe près de 40.000 espèces vivant sous toutes les latitudes. Leurs sécrétions essentielles sont les laques, les soies et les cires et dans ce travail nous sommes proposés d'étudier la composition des cires de différentes cochenilles.

Dans un premier chapitre nous faisons une description rapide des caractères généraux des cochenilles et donnons leur classification dans le but de montrer la place taxonomique des différentes espèces dont il est question dans le texte.

Le deuxième chapitre est une étude bibliographique des techniques qui se sont succédées pour l'étude des cires animales, végétales et minérales depuis l'analyse élémentaire jusqu'à la chromatographie en phase gazeuse.

Nous exposons enfin nos recherches que nous avons divisées en deux parties :

- étude de la cire de Gascardia madagascariensis, nous avons été amenés à mettre au point les méthodes d'étude des constituants des cires.

- application de ces méthodes aux cires de 6 autres espèces de cochenilles: Icerya purchasi, Ceroplastes ceriferus, Ceroplastes rusci, Pulvinaria floccifera et Quadraspidiotus perniciosus.

CHAPITRE I

LES COCHENILLES ET LA SECRETION DES CIRES

I. CARACTERES GENERAUX ET CLASSIFICATION DES COCHENILLES.

Les insectes de la super-famille des Coccoïdea ou Cochenilles, appartiennent à l'ordre des Homoptères, super-ordre des Hémiptères. Ils sont de très petite taille, de 0,5 mm à 30 mm, les plus répandus, les Diaspines, ayant de 1 à 2 mm; la cochenille la plus grande actuellement connue, est vraisemblablement Aspidoproctus maximus Lounsb. du Tanganyika dont la taille atteint 40 mm. (1)

On les trouve sous toutes les latitudes, mais c'est dans les régions chaudes, et plus particulièrement près des Tropiques qu'elles existent en plus grand nombre. Elles sont le plus souvent sédentaires vivant en parasites des végétaux supérieurs, troncs, feuilles, fruits, des arbres et des arbustes, cependant certaines espèces préfèrent les mousses et les fougères.

D'après Balachowsky (1) le nombre des espèces actuellement connues ne dépasse pas 4.000, mais il est probable que ce chiffre ne représente pas plus de 10 % de la totalité des cochenilles vivant sur le globe.

C'est donc environ 4.000 espèces qui doivent être étudiées et classées et il ne faut pas s'étonner qu'une quinzaine de classifications, souvent contradictoires, aient déjà été proposées pour cette seule famille depuis celle de Targioni-Tozzetti en 1868 jusqu'à celle de Balachowsky en 1948 (1). La prospection coccidologique en est seulement à ses débuts et l'on comprend

aisément le caractère provisoire de la classification alors que tant de contrées riches au point de vue faunistique sont encore très peu explorées: Amérique tropicale, Afrique équatoriale et orientale, îles du Pacifique et de l'Océan Indien, Chine.

Nous avons adopté la classification de Balachowsky qui assigne aux Coccoïdea le rang de super-famille dans l'ordre des Hémiptères-Homoptères. Elle est établie d'après la morphologie des mâles et elle comprend trois grandes familles, elles-mêmes subdivisées en tribus, genres et espèces (Tableau I). Voici les caractères morphologiques de ces 3 familles :

- 1) Margarodidae : stigmates abdominaux dorsaux à tous les stades, mâles pourvus d'une paire de gros yeux latéraux.
- 2) Lecanidae : mâles de type lécanofide à tête séparée du thorax par un cou, absence d'yeux composés.
- 3) Diaspididae : mâles dépourvus d'yeux composés et de cou, cuticule de la femelle tapissée de nombreux types de glandes tégumentaires.

Comme toutes les classifications, celle-ci comporte une certaine part d'arbitraire, et il est quelquefois difficile de placer un insecte dans une famille préférentiellement à une autre: c'est ainsi que les Cylindrococcinae et les Conchaspinae, sous-famille des Lecanofidae ont d'étroites ressemblances avec les Diaspididae et plusieurs genres, qui appartenaient autrefois aux Lecanidae ont été détachés et groupés chez les Diaspididae : ainsi, Phenicoccus, Halimococcus, Fagisuga, Archaspis et Scutare.

Ces exemples illustrent le caractère aléatoire des classifications actuelles des cochenilles.

Le tableau I schématise la classification proposée par Balachowsky en 1948 mais nous n'avons indiqué pour chaque tribu que quelques genres; quant aux espèces, nous avons mentionné seulement celles dont il est question dans le texte.

II. LES SECRETIONS DES COCHENILLES: SOIES, LAQUES ET CIRES

L'importance des sécrétions donne à ces insectes une ornementation qui peut masquer en partie ou en totalité la morphologie propre du corps. Ces sécrétions ne font pas partie du tégument des cochenilles, elles sont extérieures à lui et élaborées par de très nombreuses glandes réparties sur l'ensemble du corps.

Bénassy (2) a fait une intéressante mise au point sur "les sécrétions tégumentaires chez les Coccidés" et décrit les structures anatomiques des glandes tégumentaires. Nous retiendrons simplement qu'elles dérivent toutes d'un même type primitif d'origine hypodermique évoluant dans deux directions principales: multiplication et juxtaposition de la glande primitive, puis spécialisation en micropores, macropores et filières responsables chez les Diaspines, des différentes sécrétions de l'insecte.

La soie, la laque et la cire sont les trois principales substances secrétées par les cochenilles mais la dernière est de beaucoup la plus importante.

Les sécrétions soyeuses se rencontrent chez les cochenilles les plus évoluées, les Diaspines, chez qui elles complètent l'ornement du bouclier, ce revêtement protecteur à base de cire dont nous reparlerons plus loin avec quelques détails.

Les laques enduisent le tégument dorsal de certaines Lécánines (Saissetia olea , Lecanium corni), le rendant ainsi plus ferme, mais les vraies cochenilles à laque sont les Lacciferinæ, une sous-famille des Lecanoïdæ représentée surtout dans les régions

tropicales. Pesson (3) explique la biologie de ces Coccidés:

"Les larves de ces insectes commencent à sécréter en abondance une sorte de résine, la laque, qui recouvre entièrement leur corps. En conséquence, elles deviennent obligatoirement sédentaires, et après la première mue, pattes et antennes deviennent rudimentaires. Trois orifices perforent l'épaisse couche de laque: deux d'entre eux se rapportent aux stigmates, le troisième à l'anus. De la sorte l'insecte peut respirer et évacuer son miellat(*).. Ces cochenilles vivent le plus souvent en colonies très nombreuses et très denses, et leurs sécrétions se fusionnent en une masse résineuse unique qui englue la branche qui les porte. Ce cylindre de laque (bâton de laque) est constellé de taches cireuses disposées par groupe de trois, correspondant aux orifices respiratoires et à l'orifice anal des insectes." Laccifer lacca, des Indes, est la principale espèce produisant cette laque très utilisée dans l'industrie.

La cire est sécrétée par toutes les cochenilles, mais cette sécrétion a des formes et une consistance très différentes suivant les espèces et détermine en partie la classification des Coccidés.

1) Les Pseudococcini et quelques Lecanini ont le corps recouvert d'une sorte de farine, qui est une cire d'aspect pulvérulent, laissant voir la forme du corps. Quelques Pseudococcus secrètent des ornements cireux particulières qui les rendent assez reconnaissables.

Les femelles adultes de ces cochenilles ont des pattes et des antennes normalement développées, elles sont donc mobiles.

(*) Le miellat est constitué d'excréments liquides riches en sucres.

TABLEAU I

Classification des Cochenilles

<u>Famille</u>	<u>Sous-famille</u>	<u>Tribu</u>	<u>Genre</u>	<u>Espèce</u>
MARGARODIDAE	Ortheziinae	Ortheziini	Orthezia	
	Margarodinae	Xylococcini		
		Steingeliini		
		Margarodini		
		Coelostomidiini		
		Monophlebini	Aspidoproctus	maximus pertinax <u>purchasi</u>
			<u>Icerya</u>	
			<u>Steatococcus</u>	
			Labioproctus...	
	Phenacoleachinae		Phenacoleachia	zelandica (esp. Unique)
	Kermina	Pseudococcini	Pseudococcus	citri
			Ripersia	
			Phenacoccus...	
		Eriococcini	Eriococcus	
			Gossyparia	spuria
			Trabutina	mannipara
			Gymnococcus...	
	Lacciferinae	Kermesiini	Kermes	vermilio
		Lacciferini	Laccifer	<u>lacca</u>
			<u>Metatachardia</u>	
			Tachardiella	
STICTOCOCIDAE		Tachardini	Tachardina	theae
			Afrotachardina	
	Stictococcinae		Stictococcus (g. unique)	
	Lecaniinae	Lecanini	Ericerus	pela
			Saissetia	oleae
			Lecanium	corni
			<u>Ceroplastes</u>	<u>ceriferus</u> <u>destructor</u>

LECANIDAE

madagascariensis

rubens

rusci

Ctenochiton

Pulvinaria

flocifera

horii

Inglisia...

Aclerdini

Aclerda

Micrococcini

Micrococcus

Asterolecaniinae

Asterolecanium

Lecanodiaspis...

Cerococcini

Cerococcus

muratae

Dactylopiniae

Dactylopius

cacti

Apiomorphidae

une centaine d'espèces, toutes gallicoles.

Cylindrococcinae

Cylindrococcus...

Conchaspinae

Conchaspis

Diaspidinae

Xantophtalmi

Xantophtalma

concinnum(esp.unique)

Diaspidini

Lepidosaphes

Pseudolacaspis

pentagona

yanonensis

Parlatorini

Parlatoria

Leucaspis...

Odonaspidini

Odonaspis...

Aspidiotini

Aspidiotus

Aonidellia

aurantii

Aonidia

Chrysamphales

Quadraspidotus

perniciosus

Selenaspis...

Phoenicococcinae

Phoenicococcus

Halimococcus

Fagisuga

DIASPIDIDAE

les larves mâles peuvent sécréter une masse de cire de la taille d'un oeuf de poule; quand les insectes se rassemblent, les sécrétions fusionnent et enduisent l'arbre d'une sorte de croûte : c'est la croûte secrétée par Ceroplastes (Coccus) ceriferus qui est à l'origine de la "cire de Chine" étudiée plus loin.

2) La cire se présente parfois sous forme de plaques ou de lamelles qui protègent les téguments mous des insectes . Les Ceroplastes (Lecaninae) et les Orthezia appartiennent à cette catégorie. Les Orthezia font partie de la sous-famille des Ortheziinae, l'une des plus homogènes et des plus primitives des Coccidés.

3) Sur certains végétaux on aperçoit des petites écailles dures, d'aspect parcheminé, de couleur variable (jaune , vert , etc....) de 1 à 1,5 mm de diamètre, adhérant étroitement à la plante. Si on décolle cette écaille, elle a l'aspect d'un véritable follicule ou bouclier secrété par la cochenille qui vit à l'intérieur.

A ce type appartiennent les larves mâles des Lecaninae qui y subissent leurs métamorphoses. De nombreuses femelles des Lecaniinae (Ctenochiton, Inglisia) et tous les Asterolecaniinae s'enkystent aussi de cette façon. La morphologie de ces insectes s'est adaptée à cette vie sédentaire, ils ont des antennes réduites et n'ont ni pattes, ni yeux.

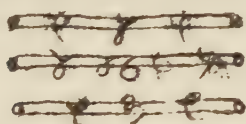
Mais, la sous-famille des Diaspidinae (famille des Diaspididae) est le type le plus répandu des cochenilles entourées d'un follicule. Elles sont encore plus petites et ont une morphologie encore plus simplifiée que les Asterolecanium . La structure du bouclier a été très étudiée (4) (5) : il proviendrait de deux sortes de sécrétions: des filaments cireux agglomérés entre eux par un produit dissolvant. L'analyse chimique de ce bouclier permet de distinguer deux groupes de constituants

différents: des lipides et des protides en proportions sensiblement égales (6). Cependant, les études chimiques sont encore très fragmentaires.

Benassy (2) rapporte les résultats obtenus par Disselkamp (7) et Rota (5) lors de l'identification des acides aminés sécrétés par le Pou de San José (Quadraspidiotus perniciosus) : "par des méthodes différentes (chromatographie, colorations classiques), ces deux auteurs arrivent à mettre en évidence la présence de composés phénoliques dérivés du métabolisme des amino-acides aromatiques."

4) Les sécrétions cireuses que nous venons d'étudier sont spécifiques d'une ou de plusieurs familles de Coccidés, mais la plupart des femelles ont la propriété commune de sécréter un amas de cire dans lequel elles déposent leurs oeufs: c'est l'ovisac.

Comme son nom l'indique, c'est une sorte de sac constitué par deux types de filaments cireux de 2 à 2,5 μ de diamètre élaborés par des glandes cirières différentes. Il y a de longs fils qui forment le bâti, l'armature de l'ovisac et une masse de petits fils courts enroulés sur eux-mêmes et enchevêtrés dans les



grands filaments (8). L'intérieur de l'ovisac ressemble ainsi à une bourre de coton dans laquelle les oeufs sont abrités tout en étant isolés les uns des autres.

"Structure de l'ovisac" (d'après Matheson)

Sulc(9) suppose que les filaments de grandes dimensions sont le résultat de deux sécrétions simultanées: une cire et une substance "agglomérante". Pollister (4) confirme cette hypothèse et précise que cette deuxième substance est une "huile volatile".

La forme et la couleur de cet ovisac varient avec les cochenilles: celui des *Pseudococcus* n'a pas de forme très définie, l'insecte peut l'abandonner seulement ébauché et continuer à

pondre à l'extérieur.

"Icerya purchasi est caractérisé par le développement énorme de son ovisac cireux, d'un blanc pur, formé de fines cana-
lures dirigées longitudinalement. Cet ovisac est bourré intérieure-
ment d'oeufs d'un rouge vermillon intense" (10). Comme tous
les Margarodinae, Icerya purchasi a des antennes et des pattes
bien développées et très mobiles et peut même se déplacer avec
son ovisac.

Chez certaines Monophlébines (*Steatococcus*, *Aspidoproctus*, *Labioproctus*) les oeufs sont simplement déposés dans un
repli de l'abdomen.

Les Lecanines peuvent sécréter un ovisac qui adhère
au corps de la femelle, mais d'autres gardent leurs oeufs sous
leur corps, qui dégénère, se dessèche et ne sert plus qu'à pro-
téger les oeufs.

Quant aux Diaspines, leur ovisac est accolé au corps
de l'insecte et, comme lui, à l'abri sous le bouclier. Enfin ,
quelques cochenilles de la tribu des Eriococcini ne recouvrent
pas leur ovisac mais sont, au contraire, enveloppées et englobées
par lui: c'est le cas de Gossyparia spuria Ménétriér et des Eriococ-
cus.

III. INTERET ECONOMIQUE DES COCHENILLES

Certains produits sécrétés par les cochenilles étaient
autrefois très utilisés : le colorant carmin, préparé à partir
de Dactylopius cacti du Mexique a été à l'origine d'un commerce
très prospère pour les Espagnols au XIX^e siècle (*). En Europe,

(*) C'est toujours cet insecte qui fournit la "teinture de
cochenilles".

on utilisait une teinture rouge venant de Kermès vermilio et la teinture des tuniques des Pharaons provenait aussi d'un Kermes.

Nous avons déjà signalé la cire de Ceroplastes ceriferus dont les Chinois se servaient pour fabriquer les bougies de luxe. Il est, d'autre part, assez surprenant de penser que la manne dont se sont nourris les Hébreux dans le désert du Sinaï était vraisemblablement le miellat d'une cochenille de la tribu des Eriococcini, "Trabutina mannipara Ehr. " (3) . Les Arabes du désert connaissent encore ce miellat sucré qu'ils appellent "Man".

Mais ce sont surtout les Lacciferinae, répandus aux Indes, à Madagascar, en Australie et au Mexique qui fournissent une laque récoltée par les indigènes et utilisés dans la fabrication des vernis, des isolants électriques, de la cire à cacheter, etc....

Malheureusement, de nos jours, les cochenilles sont surtout connues par les ravages qu'elles produisent dans l'agriculture. Elles se développent sur les végétaux dont elles se nourrissent en aspirant la sève. On connaît les dégâts causés par le Pou de San José dans les cultures de pêchers du midi de la France, Ceroplastes rusci est appelée la "cochenille du figuier". Balachowsky et Mesnil (10) étudient plus de 500 espèces de Coccidés nuisibles pour la seule région du Midi de la France. La pulvérisation d'insecticides est le moyen de défense classique, mais il est inefficace pour la destruction des Diaspines protégées par leur bouclier cireux; c'est seulement à l'époque de l'éclosion des larves que ces Coccidés sont sensibles aux traitements.

Les cires étant les sécrétions les plus importantes des cochenilles et leur composition chimique étant encore très imparfaitement connue, nous avons pensé qu'il serait intéressant de l'étudier en utilisant les techniques nouvelles de la chimie des lipides. Nous avons aussi l'espoir que la connaissance plus précise de la composition des cires protectrices de l'insecte

pourrait éventuellement apporter un élément supplémentaire à la recherche dans le domaine des insecticides : ce serait un grand bienfait pour l'agriculture de trouver contre les cochenilles un traitement actif à toute époque de l'année.

CHAPITRE II

LA COMPOSITION DES CIRES NATURELLES

I. METHODES D'ETUDE DES CIRES

A- La Chimie des cires jusque vers 1950

Les cires sont des produits naturels relativement abondants, d'obtention facile, aussi ont-elles été l'un des premiers matériaux d'étude des chimistes. Il est intéressant de constater que l'évolution des techniques d'analyse dans le domaine des substances naturelles peut être suivie très facilement dans ses applications à la chimie des cires, l'apparition de méthodes nouvelles se traduisant généralement par un renouveau dans l'étude des cires. Les premiers chimistes se sont adressés à la cire d'abeille et jusqu'en 1926 seules les méthodes chimiques ont donné un aperçu de sa composition. A partir de 1930 les méthodes physiques, plus spécialement les rayons X, sont appliquées à l'étude des cires puis les recherches tombent en léthargie jusqu'à l'apparition des techniques chromatographiques, en particulier de la chromatographie gaz-liquide. Depuis quelques années les travaux sur les cires naturelles connaissent un renouveau et la structure de plusieurs d'entre elles est déjà connue.

Il nous a semblé intéressant de montrer cette évolution des techniques d'analyse dans la chimie des cires et d'illustrer ensuite les progrès réalisés dans la connaissance de leur composition en choisissant la cire la mieux connue, la cire d'abeille.

1. Premières recherches sur la composition des cires

Il y a près de deux siècles que l'étude des cires animales est l'objet des travaux des chimistes puisque déjà en 1784 Lavoisier donne une analyse de la cire d'abeille :

" Pour une livre de cire :

" substance charbonneuse : 13 onces, 1 gros, 23 grains

" gaz inflammable de l'eau: 2 onces, 6 gros, 49 grains " (11)

Dès le XIX^e siècle de nombreux chimistes s'intéressent à la composition de la cire d'abeille et les résultats font l'objet d'une importante bibliographie résumée dans la thèse de Georges Damoy en 1924 : "Contribution à l'étude chimique de la cire d'abeille" (12).

L'analyse élémentaire est, au début, le seul moyen d'étude dont disposent les chimistes et des analyses de cire d'abeille brute sont effectuées dès 1811 par Gay-Lussac et par d'autres chercheurs (13)(14)(15)(16).

En 1814 John (17) fractionne la cire brute en deux constituants la myricine insoluble dans l'alcool, la cérine soluble seulement à chaud et en 1823 Chevreul (18) introduit la saponification qu'il applique à différents corps gras d'origine animale. Aussitôt Boudet et Boissenot (19) essaient de saponifier séparément la myricine et la cérine mais en utilisant la potasse aqueuse ils ne peuvent saponifier que la cérine dans laquelle ils identifient les acides margarique et peut-être oléique.

Parmi les nombreux travaux de cette époque donnant des résultats souvent contradictoires (20)(21)(22)(23)(24) il faut citer ceux de Deschamps (25) qui purifie l'acide de la cérine par l'intermédiaire du sel de plomb et ceux de Brodie (26)(27) qui étudie les alcools des cires après oxydation en acides.

Tous ces travaux portent principalement sur la cire d'abeille cependant deux cochenilles ont intéressé les chimistes : Dactylopius cacti étudiée par Liebermann (28) et Ceroplastes

ceriferus par Henriques (29) tandis que Bougaut (30)(31) trouve des hydroxyacides chez des cires végétales, les cires de conifères.

Parmi les premiers travaux ceux de Gascard méritent une place spéciale, il étudie la gomme laque des Indes et isole l'acide mélistique auquel il attribue la formule $C_{31}H_{62}O_2$ (32) et qu'il identifie à l'acide trouvé par Maskelyne dans la cire de Carnauba (33). Plus tard Gascard propose pour cet acide une formule en C_{32} (34) tandis que Marie avait donné une formule en C_{30} à ce même acide isolé de la cire d'abeille (35). La structure de l'acide cérotique est également discutée et on lui attribue successivement une formule en C_{25} , C_{26} et C_{27} (35) (29)(26)(36)(37). Ces difficultés tiennent au fait que les acides considérés comme purs sont en réalité des mélanges d'homologues dont la séparation était alors impossible, conclusion entrevue d'ailleurs par Gascard et Damoy (38)(39).

2. Méthode de Piper et Chibnall

Cette notion de "série d'homologues" est reprise et développée par l'équipe de Piper et Chibnall qui étudie de 1931 à 1937 la composition de très nombreuses cires animales et végétales. Piper, Chibnall et al. comparent les caractéristiques physiques des fractions obtenues par cristallisation fractionnée des cires naturelles avec celles de mélanges témoins. Ils préparent les acides gras, cétones, alcools et paraffines synthétiques ayant de 24 à 34 atomes de carbone et font des mélanges binaires et ternaires d'hydrocarbures, d'alcools, d'acétates d'alcools et d'acides normaux dont ils déterminent avec précision les caractéristiques: point de fusion, point de transition et distance réticulaire aux rayons X des différentes formes cristallines. Les identifications sont alors basées sur la comparaison des constantes physiques des fractions provenant des cires naturelles avec

celles des mélanges synthétiques. Ils définissent ainsi des règles générales dont voici un exemple concernant les points de fusion:

- Les mélanges binaires ou ternaires d'hydrocarbures ont le point de fusion de l'hydrocarbure correspondant au poids moléculaire moyen du mélange (40), il en est de même pour les esters et les acétates (41).

- Les mélanges binaires équimoléculaires d'alcools ont un point de fusion supérieur de $0,2^{\circ}$ à $0,4^{\circ}$ à celui du constituant de poids moléculaire le plus faible tandis que pour les acides le point de fusion est inférieur de $3,4$ à $4,5^{\circ}$. L'addition d'un troisième composant pair avec 2 atomes de carbone de plus, donnant un mélange ternaire équimoléculaire, augmente le point de fusion des alcools d'environ $0,5^{\circ}$ et diminue celui des acides de $0,2$ à $0,3^{\circ}$ (41).

Chibnall et al. entreprennent alors l'étude de nombreuses cires naturelles. Après saponification, fractionnement de l'insaponifiable en paraffines, alcools primaires et secondaires et méthylation des acides gras, ils soumettent les groupes d'homologues à la cristallisation fractionnée. Chaque fraction est un mélange simple dont ils identifient les composants par la méthode que nous avons exposée. C'est ainsi qu'ils étudient les cires d'insectes, cire d'abeille, des cochenilles Laccifer lacca et Ceroplastes ceriferus, de Psylla alni et des cires végétales: cires extraites de plantes tropicales, carnauba, candelilla, coton, cires de plantes et fruits des régions tempérées, feuilles de choux, d'épinards, de tabac, pétales de roses et cuticules de pommes (42).

Leurs résultats les conduisent à des conclusions sur la composition des cires naturelles. Toutes contiennent des alcools et des acides à nombre pair d'atomes de carbone de C_{24} à C_{36} et des hydrocarbures impairs de C_{25} à C_{37} . S'ils n'excluent pas la présence possible de petites quantités des homologues supérieurs

ou inférieurs ils soulignent l'absence des alcools et acides impairs ainsi que des hydrocarbures pairs. Ils portent enfin un grand coup aux études antérieures en affirmant l'impossibilité d'isoler un produit pur par des cristallisations fractionnées sauf si ce composé existe en très forte proportion, c'est le cas de l'hexacosanol dans les fourrages (43), de l'octacosanol dans le blé (44) ou du triacontanol dans la luzerne (45).

Nous avons tenu à exposer en détail cette méthode et à rapporter les conclusions de ses auteurs parce qu'elles furent acceptées par la presque totalité des chercheurs pendant 25 ans c'est-à-dire jusqu'à ce que la spectrographie de masse et la chromatographie en phase gazeuse soient appliquées au domaine assez particulier des cires.

Les travaux sur la chimie des cires sont inexistantes de 1939 à 1945 mais en 1949 c'est par la méthode de Piper et Chibnall que Shuette et Baldinus analysent la cire de candelilla (46)(47), Shuette et Khan l'utilisent encore pour les hydrocarbures de la cire d'ouricouri (48), Savidan en 1954 pour les alcools de la cire d'alfa (49) et c'est encore avec cette même technique qu'en 1959 Wiedenhoff (50) et Dalton et Mitchell (51) étudient la composition de diverses cires végétales.

3. Distillation fractionnée

Le développement de la distillation fractionnée permet la séparation rapide des mélanges homologues des cires en leurs constituants. Déjà Holde et Bleiberg (52) en 1930 avaient réussi à dédoubler l'acide cérotique de la cire d'abeille et Francis et al. l'alcool cérylique de la cire de Chine (53) par distillation des acétates mais elle est largement utilisée en 1935 par Collins (54) pour les esters éthyliques des acides de la cire de Chine et de la cire d'alfa ainsi que pour les hydrocarbures de la cire de candelilla, les produits séparés sont alors identifiés par les méthodes chimiques classiques et par leurs caractéristiques

physiques.

En 1945 Weitkamp (55) avec une colonne à distiller très efficace (56) identifie dans la cire de laine 32 acides différents appartenant à 4 séries d'homologues. En s'inspirant d'une technique de distillation amplifiée décrite par Axe et Bratton (57) il réussit à séparer les esters méthyliques d'acides normaux de ceux des acides iso, séparation impossible jusque là, les points d'ébullition respectifs étant très voisins. Les fractions provenant d'une première distillation sont dissoutes dans une paraffine dont la zone d'ébullition s'étend de 10 à 15° de part et d'autre du point d'ébullition de l'ester à isoler. Ce mélange est distillé puis une fraction étroite correspondant au point d'ébullition de l'ester est distillée à nouveau de la même manière. L'ester pur est récupéré après passage sur alumine. C'est par cette technique que Weitkamp et coll. identifient des acides pairs et impairs dans la graisse des cheveux (58).

La distillation amplifiée selon Weitkamp est utilisée par Murray et Schoenfeld (59) qui peuvent séparer sans décomposition des substances ayant jusqu'à 34 atomes de carbone. Ils font aussi une étude complète de la cire de carnauba en identifiant les alcools normaux (60) et les diols (61) par distillation de leurs acétates, les acides normaux (62) et les hydroxyacides (63) par distillation de leurs esters méthyliques. Avec la même méthode ils trouvent dans les alcools de la cire de laine une série normale (64), une série iso et une série anteiso (65).

Cette technique est employée pour chercher la composition des cires extraites d'anémones de mer (66) et pour la cire de canne à sucre (67). Plus récemment Brenner (68)(69) fait une identification presque totale de la cire de Bulnesia retama, un arbuste d'Argentine, en reprenant la méthode de distillation amplifiée.

La distillation fractionnée a été utilisée également pour les mélanges d'hydrocarbures mais il semble que ce soit avec

de moins bons résultats. Ainsi Schuette et Khan dans la cire d'ouricouri (48) et Horn dans la cire de laine (70) identifient seulement des paraffines à nombre pair d'atomes de carbone alors que l'on sait aujourd'hui que si les hydrocarbures pairs peuvent exister à l'état de traces, ce sont toujours les homologues impairs qui sont prédominants dans les cires animales et végétales.

Citons encore les applications de la distillation moléculaire au fractionnement des cires non hydrolysées utilisée par Findley et Brown (71) pour en terminer avec cette première période de l'étude des cires. En effet le problème du fractionnement des cires et de l'identification des constituants devait être résolu avec l'apparition de nouvelles méthodes en particulier des méthodes chromatographiques.

B- Etat actuel de la chimie des cires

Depuis une dizaine d'années les techniques autrefois classiques que nous avons décrites sont de moins en moins utilisées dans l'étude des cires, il semble d'ailleurs que ces techniques aient été exploitées au maximum de leurs possibilités. Pour pénétrer plus avant dans la connaissance des cires naturelles, il était nécessaire d'utiliser d'autres méthodes. Nous signalerons rapidement quelques-unes d'entre elles assez rarement employées et nous insisterons davantage sur les méthodes chromatographiques qui ont connu une généralisation beaucoup plus étendue.

1. Méthodes non chromatographiques

En 1953, Findley et Brown (71) déterminent la composition d'une cire par la mesure de différents indices : indice d'acide, d'ester et d'hydroxyle, dosages des fonctions aldéhyde

et cétone. Ils en déduisent la proportion des différents groupes d'homologues et décèlent aussi la présence d'hydroxyacidess'. Malgré le caractère assez sommaire de cette analyse qui ne donne pas la composition exacte de chaque groupe, elle a été utilisée pour la cire d'ouricouri (72) et pour la cire extraite de la tourbe (73).

Une autre méthode proposée par Gilby et al. (74)(75) est basée sur la mesure de la tension superficielle d'une couche monomoléculaire d'une fraction de cire. En combinant ces résultats avec l'analyse infra-rouge, Gilby obtient quelques renseignements sur la longueur moyenne des chaînes monocarbonées des cires d'une cochenille Ceroplastes destructor et de la tique du chat Boophilus microphis.

La spectrométrie de masse a été également appliquée aux cires. C'est ainsi que Nilsson (76) étudie le pollen de plusieurs plantes et que Brown et al. signalent pour la première fois en 1954 (77) l'existence d'alcools pairs et impairs dans les cires animales, les alcools pairs étant en nette supériorité. L'année suivante Wanless étudie par la même méthode les hydrocarbures de la cire de pyrèthre (78) et y trouve à la fois des hydrocarbures pairs et impairs.

L'apparition de la spectrographie de masse a mis un terme aux discussions sur la parité ou l'imparité des constituants des cires qui avaient, nous l'avons vu, été un grand sujet de recherches au début de ce siècle. C'est ainsi qu'après avoir étudié par spectrographie de masse les hydrocarbures et les alcools de différentes cires végétales Waldron et Gower peuvent conclure avec Chibnall et Piper (79) qu'elles contiennent surtout des hydrocarbures impairs avec dans quelques cas des hydrocarbures pairs et que les alcools sont essentiellement pairs avec, dans certaines plantes, de faibles quantités d'homologues impairs.

2. Méthodes chromatographiques

Les différents types de chromatographie ont été appliqués à l'étude des cires : chromatographie d'adsorption, chromatographie de partage sur papier et en phase vapeur.

1°/-Chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption semble avoir été appliquée aux cires pour la première fois en 1949 par Schuette et Baldinus (47) pour isoler et fractionner les hydrocarbures de la cire de candelilla. La cire brute en solution dans l'éther de pétrole est adsorbée sur une colonne d'alumine qui retient les constituants polaires, les hydrocarbures étant entraînés par le solvant. Après la complexité des méthodes anciennes de fractionnement on comprend que cette technique simple et rapide ait redonné un nouvel élan aux recherches sur les cires.

La séparation des hydrocarbures n'est d'ailleurs pas la seule application de la chromatographie, par un choix judicieux des adsorbants et des solvants les différents constituants des cires, hydrocarbures, esters, alcools et acides gras peuvent être isolés.

Les adsorbants les plus employés sont l'alumine (50) (73)(80)(81)(82)(83) et le gel de silice (66)(81)(84)(85)(86). Cole et Brown (72) utilisant la méthode développée par Cole en 1956 (87) fractionnent la cire d'ouricouri par deux chromatographies successives, la première sur alumine, la deuxième sur gel de silice. Cependant la plupart des chercheurs saponifient la cire au préalable et chromatographient ensuite sur alumine les esters méthyliques des acides gras et l'insaponifiable. C'est la méthode employée par Mazliak (88)(89)(90), Mac Kenna et Wheatley (91)(92), Murray et Schoenfeld (61)(62)(63).

Pour la résolution des mélanges d'homologues la chromatographie d'adsorption est beaucoup moins efficace en raison des

propriétés d'adsorption très voisines des constituants homologues à longue chaîne carbonée. Elle a cependant été utilisée par certains auteurs: Fuchs et Diebert (93) ont pu séparer dans une cire minérale des acides gras de C_{22} à C_{34} sur colonne de gel de silice basique.

La chromatographie sur alumine avec analyse frontale a été employée avec succès par Savidan pour identifier les constituants de la cire d'alfa (49) et les hydrocarbures de la cire d'ouricouri (94) tandis que Holman et Hagdahl (95) séparent sur charbon actif des acides de C_{16} à C_{20} ne différant que par un atome de carbone en utilisant un agent de déplacement, l'acide docosanoïque.

2°/-Chromatographie de partage

La chromatographie de partage présente une difficulté majeure lorsqu'on l'applique à l'analyse des constituants des cires: l'insolubilité dans l'eau des composés lipidiques de poids moléculaire élevé.

Cependant Ramsey et Patterson (96)(97) utilisant comme phase stationnaire un mélange alcool furfurylique-amino-2-pyridine saturé d'hexane fixé sur l'acide silicique et comme phase mobile l'hexane saturé d'alcool furfurylique-amino-2-pyridine parviennent à séparer des mélanges d'acides gras jusqu'en C_{19} ; la méthode peut d'ailleurs être étendue jusqu'aux acides en C_{26} . La chromatographie en phases inversées de Van den Heuvel et Vatcher (98) permet de doser les acides pairs de C_{12} à C_{24} . On peut ainsi identifier les acides volatils et les acides gras de poids moléculaire moyen qui existent parfois en faible quantité dans les cires.

La chromatographie de partage sur papier est d'un emploi encore plus limité que la chromatographie sur colonne pour l'étude des composés des cires. Pourtant la chromatographie en phases inversées avec une phase stationnaire organique et une

phase mobile aqueuse a parfois été utilisée. Elle a permis à Boldingh en 1950 (99) de séparer des esters éthyliques d'acides gras de C_{16} à C_{18} avec du papier imprégné de latex et à Hellier (32) d'identifier les acides gras de C_{12} à C_{20} dans les lipides du tabac sur papier imprégné de kérosène.

Plus récemment Kaufmann et Das (100) en se servant d'un papier paraffiné font une analyse qualitative et quantitative des acides gras pairs des cires jusqu'en C_{36} . Les résultats obtenus pour la cire d'abeille et la cire de carnauba sont en assez bon accord avec ceux de la chromatographie gaz-liquide (89)(101). C'est la même méthode qu'emploie Stoianova et Kolarova (102) pour la cire de rose mais ils n'identifient que des acides de C_{12} à C_{20} .

3°/-Chromatographie gaz-liquide

Cette méthode décrite en 1952 par James et Martin(103) convient particulièrement à l'analyse qualitative et quantitative de mélanges complexes d'homologues. Il faut attendre 1959 (104) pour voir la première application aux constituants des cires, les points d'ébullition élevés de ces composés nécessitant l'utilisation de phases stationnaires résistant aux hautes températures. A partir de cette date la plupart des cires animales et végétales déjà étudiées par les anciennes méthodes dont nous avons vu les limites sont reprises et analysées avec beaucoup plus de facilité et d'efficacité. C'est alors la découverte de nouveaux constituants existant en faible quantité qui n'avaient jamais pu être décelés jusqu'alors. La quantité minime de produit nécessaire pour une étude complète explique également le développement très rapide de la chromatographie gaz-liquide dans le domaine des cires.

Les hydrocarbures ont des points d'ébullition inférieurs à ceux des alcools et acides à même nombre d'atomes de

carbone et leur séparation par chromatographie gaz-liquide est plus facile, aussi la plupart des auteurs les étudient-ils de préférence aux composés oxygénés (104)(105)(106)(107)(108). C'est ainsi que Kranz et Downing réduisent en hydrocarbures les alcools et les acides gras des cires de canne à sucre (109), de laine (110) d'abeille (101), et chromatographient ensuite ces hydrocarbures sur colonne de silicone. De la même manière Wollrab étudie une cire minérale (86) par chromatographie gaz-liquide des hydrocarbures sur colonne d'Apiezon.

Cependant la méthode est étendue aux alcools et aux esters méthyliques des acides gras. Herwett chromatographie les esters méthyliques d'une cire minérale (111) Nicolaïdes ceux de la peau (112), Cooper (113) ceux des sédiments et Mazliak étudie directement les constituants des cires de pomme et de carnauba (88)(89). C'est cette méthode qui a servi de base à notre étude des cires de cochenille (115)(116).

La chromatographie gaz-liquide est donc une méthode analytique couramment utilisée dans le domaine des cires, Mold (117) a même pu séparer à l'état pur le pristane, 2,6,10,14-tétraméthyl-pentadécane, des autres hydrocarbures ramifiés de la cire de laine. Malheureusement les constituants habituels des cires n'ont pas encore été obtenus par chromatographie gaz-liquide préparative en raison de leur poids moléculaire trop élevé.

II. ETUDE DE LA CIRE D'ABEILLE

L'étude des résultats concernant la composition de la cire d'abeille à diverses époques illustre bien l'évolution de la connaissance de la composition chimique des cires en fonction de l'évolution des méthodes.

C'est dans sa thèse "Contribution à l'étude chimique de la cire d'abeille" (12) que Damoy en 1924 donne la première

analyse qualitative complète et résume les travaux effectués avec Gascard (39): tous les constituants sont impairs et forment des séries ininterrompues (Tableau II).

TABLEAU II

Composition de la cire d'abeille d'après Gascard et Damoy (1923)

N° de C.	Hydrocarbures	Alcools I	Acides n.
25	+	+	+
26			
27	+	+	+
28			
29	+	+	+
30			
31	+	+	+

En 1934 Chibnallet Piper reprennent l'étude de la cire d'abeille en appliquant leur nouvelles méthode, comparaison des caractéristiques physiques avec celles des mélanges binaires et ternaires synthétiques (42). Ils étudient les 4 fractions "alcool" isolées par Gascard et Damoy et ils montrent qu'en réalité chacune est un mélange binaire ou ternaire des alcools pairs voisins et dans les 4 fractions ils identifient 6 alcools différents (Tableau III).

Ils admettent que les acides ont le même nombre d'atomes de carbone que les alcools identifiés tandis que la série d'hydrocarbures va bien de C_{25} à C_{31} , les fractions de Gascard et Damoy (39) étant en fait des mélanges.

TABLEAU III

Etude par Chibnall et al. (1934) des 4 fractions alcool isolées
de la cire d'abeille par Gascard et Damoy en 1923

Fractions de Gascard et Damoy (1923) (30)	Composition de Chibnall et al. (1934) en % de la fraction totale					
	C ₂₄	C ₂₆	C ₂₈	C ₃₀	C ₃₂	C ₃₄
alcool néocérylique C ₂₅ H ₅₂ O	40	40	20			
alcool cérylique C ₂₇ H ₅₄ O		50	50			
alcool montanyl C ₂₉ H ₆₀ O			40	40	20	
alcool myricyle C ₃₁ H ₆₄ O				40	40	20

Nous avons résumé dans le Tableau IV la composition que Chibnall et Piper donnent à la cire d'abeille

Plus tard deux autres acides sont encore isolés dans cette cire: l'acide palmitique par Büchner en 1937 (118) et l'acide 14-hydroxyhexadecanoïque par Toyama et Hirai en 1951(119).

Mais ce n'est qu'en 1961 que la combinaison de la chromatographie par adsorption et de la chromatographie gaz-liquide permet à Downing et al. de fournir une étude complète et quantitative de la cire d'abeille. Voici la composition qu'ils donnent à la cire saponifiée:

Hydrocarbure <u>n</u> :	16 %
Alcools primaires :	31 %
Acides <u>n</u> :	31 %
Hydroxyacides :	13 %
Diols :	3 %
Non identifié :	6 %
(pigments, propolis)	

TABLEAU IV

Composition de la cire d'abeille selon Chibnall et Piper(1934)

N° de C.	Hydrocarbures	Alcools I	Acides n.
24		+	+
25	+		
26		+	+
27	+		
28		+	+
29	+		
30		+	+
31	+		
32		+	+
33			
34		+	+

Le Tableau V indique le pourcentage de constituants dans chacun des groupes. La très forte proportion d'acide palmitique ($C_{16}H_{32}O_2$) et d'acide tétracosanoïque explique pourquoi ils avaient déjà été isolés l'un et l'autre (118)(119). La structure exacte des hydroxyacides n'est pas précisée, les auteurs supposent que l'acide 14-hydroxypalmitique de Toyama(119) fait partie d'une série homologue.

Cette brève étude chronologique de la cire d'abeille illustre la découverte progressive de la complexité des substances naturelles au fur et à mesure que progressent les méthodes d'analyse.

TABLEAU V

Composition de la cire d'abeille d'après Downing et al.(1961)
exprimée en % de chaque groupe

Nombre d'atomes de carbone	Hydro- carbures	Alcools I	Diols	Acides	Hydroxyacides
12				0,3	0,4
14				0,8	1,5
16				50,5	58,5
17				0,3	0,4
18				8,5	9,8
19				---	traces
20	{ 0,5		traces	0,9	4,1
21	0,8		---	---	-
22	0,3		traces	2,0	1,6
23	3,7		-	0,3	0,4
24	0,6	11,9	15,2	17,5	8,2
25	7,5	-	-	traces	0,5
26	1,2	10,1	19,6	4,9	3,7
27	26,8	traces	traces	traces	0,3
28	2,2	14,8	39,2	4,3	1,9
29	19,3	traces	2,6	traces	0,5
30	1,6	31,6	14,8	3,0	0,6
31	20,8	traces	2,2	traces	1,5
32	0,9	23,5	6,5	4,7	0,4
33	13,8	-		-	
34		5,4		2,0	
35		-		-	
36		2,7			

CHAPITRE III

TECHNIQUES UTILISEES

I. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1. Chromatographie sur colonne

Les différents constituants des cires ont été fractionnés par la technique du chromatogramme liquide développée par Reichstein et al. (120)(121)(122), cependant les cires étudiées étant insolubles dans les solvants à température ordinaire nous avons employé des colonnes chauffantes. Les éluats sont recueillis par fractions d'égal volume, le solvant évaporé et la quantité de substance élue est déterminée par pesée.

Les adsorbants utilisés sont :

L'alumine neutralisée par l'acide chlorhydrique puis lavée à l'eau distillée et séchée à l'étuve à 120° pendant 48 heures. Elle est ensuite tamisée (150-250 mesh) et son activité déterminée par la méthode de Brockmann (123).

Le trisilicate de magnésium (Siegfried) activé pendant 24 heures à 80° et utilisé avec la Célite 545 dans la proportions 2-1.

Le carbonate de sodium anhydre (100-250 mesh) utilisé en raison de sa basicité et de ses très faibles propriétés adsorbantes pour séparer les acides de l'insaponifiable.

Les solvants employés classés d'après leur pouvoir éluant croissant sont :

- l'éther de pétrole distillé (Eb. 55°-70°) séché sur

sodium, l'hexane distillé ou le tétrachlorure de carbone distillé.

- le benzène distillé séché sur sodium.
- l'éther rectifié séché sur chlorure de calcium.
- le chloroforme distillé séché sur sulfate de sodium.
- l'éthanol distillé sur sodium.
- le chloroforme avec des proportions d'acide acétique de 1 à 5 %.

Les mélanges: éther de pétrole - benzène
hexane - benzène
benzène - éther
benzène - méthanol
méthanol - chloroforme

en proportions variables ont également été utilisés.

Les colonnes chauffantes comprennent une double enveloppe chauffée par des vapeurs d'éther, d'éther de pétrole ou d'acétone suivant la température désirée. Dans certains cas nous utilisons une bande chauffante (modèle "Isotap") entourant la colonne.

2. Chromatographie gaz-liquide

L'étude des mélanges homologues d'hydrocarbures, d'alcools et d'esters méthyliques a été réalisée par chromatographie gaz-liquide sur Aérogaph A 90 P équipé d'une cellule de détection à résistances.

Le gaz porteur est l'hélium, débit 50-60 ml/min. La colonne utilisée contient 20 % de silicone rubber sur Firebrick (60-80 mesh), longueur 1,60 m, diamètre intérieur 6,25 mm.

Les chromatographies sont faites soit à température constante soit le plus souvent avec programmation de 180° à 320°C. Les produits sont injectés en solution dans le dioxanne à 50°.

Les résultats quantitatifs sont obtenus à partir des

chromatogrammes par la méthode de triangulation (124).

II. TECHNIQUES DIVERSES

1. Analyses élémentaires

Les microdosages de carbone, hydrogène, C-CH₃, O-CH₃ ainsi que les microdéterminations de masse moléculaire selon Rast ont été effectués soit au laboratoire de micro-analyse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, soit au Laboratoire de micro-analyse de la Ciba (Bâle)

2. Points de fusion

Les points de fusion ont été pris avec le microscope à platine chauffante de Köfler.

3. Titrages acidimétriques

Nous avons utilisé une ultramicroburette de Gilmont pour des quantités de substance de l'ordre du milligramme. Les dosages sont effectués par la potasse alcoolique N/100 titrée par l'acide benzoïque en présence de phénol-phtaléine. Les substances sont en solution chloroformique, le solvant ayant été séché et débarrassé des traces d'acide par un séjour sur carbonate de sodium.

4. Déterminations spectrophotométriques

Les spectres infra-rouge ont été effectués au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon sur un appareil Infra-Cord Perkin-Elmer.

Nos spectres de rayons X sont dûs à l'amabilité de Madame S. Barbezat, du laboratoire du C.N.R.S. de Bellevue.

III. DISTILLATION FRACTIONNEE

Les distillations ont toujours été faites sur de petites quantités, de 10 à 500 mg dans un tube à boules. La substance est introduite au fond du tube qui est chauffé dans un bain d'air. Au cours de l'opération le tube est retiré progressivement du bain d'air ce qui permet de fractionner le distillat. Le même tube à boules a été utilisé pour les réactions de pyrolyse.

N.B. - Nous avons eu à notre disposition l'appareil à chromatographie gazeuse à la fin de nos travaux de recherche sur les cires de *Gascardia Madagascariensis*, la majeure partie du travail a donc été réalisée par les techniques classiques utilisées avant la chromatographie gaz-liquide : en particulier l'analyse aux rayons X. Nous avons pu par chromatographie gazeuse vérifier et compléter les résultats obtenus précédemment.

CHAPITRE IV

ETUDE DES CIRES DE GASCARDIA MADAGASCARIENSIS

Gascardia Madagascariensis Targioni-Tozzetti est une cochenille qui vit à Madagascar et parasite presque exclusivement un arbuste du sud de l'île, Rhizogum madagascariense Drake ou Hazontaha: avec ses fleurs jaunes et ses feuilles de petites dimensions donc peu exposées à l'évaporation et aux rayons du soleil l'Hazontaha est une plante caractéristique de la brousse des zones désertiques de l'Audroy. Gascardia Madagascariensis se rencontre encore sur quelques autres végétaux, le Somongy, le Manateza, et même sur des palétuviers de la côte ouest de l'île.

Comme beaucoup de cochenilles elle ne vit pas seule mais en association avec des fourmis et dans sa "Faune de Madagascar" Paullian lui consacre quelques lignes (125) : "parmi les cochenilles myrmécophiles une place spéciale doit "être faite à Gascardia Madagascariensis Targ.Toz. qui forme "des colonies entourées d'amas cireux atteignant la taille du "poing, colonies jouant le rôle d'abri et peut-être aussi de "réserve de substances sucrées pour les Camponatus Mayr. ; "l'association est si constante que les amas de Gascardia sont "nommés par les malgaches "Lokombitsika" c'est-à-dire "cire "de fourmi ".

Gascard (32) nous apprend que ce surnom est expliqué dès 1661 par le sieur de Flacourt, dans son "Histoire de la grande isle de Madagascar", il rapporte que ces colonies sont appelées par les indigènes "Litin-bitsic" (litin veut dire

gomme ou résine et bitsic signifie fourmi): "C'est la gomme que
 "produit une espèce de fourmi dans les Ampâtres (*), elle est
 "blanche et attachée à une petite branche de bois, l'on voit
 "dedans les petites fourmis attachées... je crois que c'est le
 "vrai Cancannum de Dioscoride. Le vulgaire s'en sert à faire
 "tenir les sagaies dans leur manche".(126)

Une description plus complète de cette gomme-laque
 est due à Gascard (32): "La gomme-laque de Madagascar se présente
 "en masses sphériques ou ovoïdes, traversées par une branche sui-
 "vant leur plus grand axe. La grosseur, aussi variable que la
 "forme, atteint à peine celle d'un oeuf de pigeon. La couleur est
 "d'un jaune grisâtre, la surface rugueuse présente des marbrures
 "plus blanches dues à ce que la couche extérieure très faible
 "s'est détachée en ces points et laisse apercevoir d'autres par-
 "ties moins colorées.... Si on brise une de ces masses, les débris
 "de gomme-laque séparés du rameau présentent à leur intérieur une
 "grande quantité d'alvéoles bruns. Ces alvéoles sont constitués
 "par les carapaces des insectes femelles incrustées dans la gomme-
 "laque; on peut les enlever facilement et à leur place reste une
 "empreinte plus ou moins globuleuse. L'intérieur des enveloppes
 "d'insectes est rempli d'une poussière brune... On rencontre aussi
 "très souvent dans cette gomme-laque des orifices circulaires
 "ayant servi à la sortie des parasites dont les cocons se trou-
 "vent à l'intérieur."

La première étude morphologique de cette cochenille a
 été faite en 1893 par l'Italien Targioni-Tozzetti (127) qui la
 place dans la classification des cochenilles parmi les Lacciferi-
 nae ou Cochenilles à laque. Mais en 1921 Mac Gillivray (128)
 trouve qu'elle est mieux à sa place dans les Ceroplastes, tandis
 que Green (129) la classe dans un genre "allié" aux Ceroplastes:
 ceci a été confirmé plus récemment par Mamet (130) qui propose
Ceroplastes Madagascariensis T.T. comme synonyme de Gascardia

(*) Ampâtres: régions entre Fort Dauphin et le Cap Ste Marie.

Madagascariensis T.T.

La cire secrétée par Gascardia Madagascariensis n'a encore été l'objet d'aucune étude chimique, seul Gascard en 1893 (32) constate la présence de résines et de cires, assez difficiles à séparer, ces dernières seraient constituées d'alcool en C_{26} estérifié par de l'acide formique et des acides azotés.

Les renseignements de Jacob de Cordemoy sont aussi sommaires (131): il constate que la gomme-laque de Madagascar se différencie de celle des Indes (Laccifer lacca) par l'absence de matières colorantes et la teneur différente en cires et en résines qui sont en outre chimiquement distinctes.

Nous avons donc entrepris une recherche de la composition de cette cire: nous l'avons fractionnée en ses différents constituants et nous avons identifié les hydrocarbures, les alcools et les acides gras. Nous avons enfin cherché comment sont associés ces éléments dans la cire originelle.

I. EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES CIRES

A. RESULTATS OBTENUS

1. Extraction des cires

Les solvants habituellement employés pour l'extraction des cires sont variés : le chloroforme est utilisé par Gilby et Alexander (74) et Hackmann (132), le trichloréthylène par Murray et Schoenfeld (65), l'éther par Masami (133); le benzène (134), l'alcool éthylique (135)(136), le skellysolve B (51) et le kérosène (135) sont également signalés. Les mélanges alcool-benzène (34)(137)(138), éther-benzène (139); benzène-acétone (49) ont l'avantage de séparer les résines des cires et de donner de bons rendements.

Nous avons nous-même essayé plusieurs solvants. Le trichloréthylène dissout 75 % de la substance brute mais la séparation ultérieure des cires et des résines s'est avérée laborieuse, sinon impossible. Théoriquement, les cires et les résines sont solubles à chaud dans l'alcool et à froid seules les cires précipitent, cependant les résultats sont assez décevants; cette méthode ne donne pas une bonne séparation, les cires obtenues restent toujours imprégnées de résines même après plusieurs lavages à l'alcool.

C'est finalement une méthode inspirée des travaux de Schuette et Khan sur la cire d'ouricouri (48) et de Chibnall et al. sur la cire de pomme (140) qui nous a donné les meilleurs résultats. Le solvant utilisé est l'éther de pétrole qui dissout à chaud cires et résines; les résines sont extraites par plusieurs épuisements à l'acétone bouillant : seules les résines sont solubles à froid dans l'acétone et la fraction insoluble (9 % du

produit brut) se présente comme une poudre blanche: ce sont les cires.

Après évaporation de l'acétone on recueille les résines, soit 19 % de la matière première : c'est une substance visqueuse, transparente, jaune rougeâtre, laissant apparaître après un certain temp de repos des cristaux au sein de sa masse.

L'éther de pétrole extrait donc 28 % du produit de départ et les cires proprement dites en constituent seulement 9 %. La partie non extraite est une masse brune qui contient des substances résineuses à côté de déchets divers : débris de bois, carapaces d'insectes, etc...

2. Fractionnement des cires

1°/ Etude comparative de diverses techniques

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre II, p. 21) les cires sont en général hydrolysées puis les fractions acide et insaponifiable sont étudiées séparément. Cette méthode a l'inconvénient de ne pas donner de renseignements sur la nature des esters présents initialement dans les cires animales et végétales.

Aussi Schuette et Khan (48) fractionnent-ils la cire d'ouricouri sans saponification préalable par différence de solubilité dans l'acétone et l'éther de pétrole, mais ils n'obtiennent pas de séparation effective des constituants.

Fuchs et Jong (81) pour la cire d'abeille et Wiedenhoff (50) pour plusieurs cires végétales font une chromatographie directe sur alumine. C'est aussi par chromatographie sur alumine (activité IV) suivie d'une rechromatographie sur gel de silice que Cole et Brown (72) fractionnent avec un certain succès la cire d'ouricouri, tandis que Dalton et Mitchell (51)

utilisent le phosphate tricalcique puis l'acide silicique.

Nous avons nous-même chromatographié directement la cire de Gascardia sur colonne d'alumine mais les résultats obtenus n'ont pas été encourageants: les premiers éluats par l'éther de pétrole comprennent un mélange d'hydrocarbures et d'esters. La séparation de ces esters par chromatographies répétées sur colonne d'alumine ne s'est jamais révélée totale et nous avons abandonné cette voie pour chercher en premier lieu à identifier les constituants des cires : hydrocarbures, alcools et acides.

Le procédé classique d'isolement des constituants lipidiques est basé sur la solubilité dans l'eau des sels alcalins d'acides gras alors que l'insaponifiable est soluble dans l'éther. Dans le cas des cires le problème est plus complexe les acides gras ayant un poids moléculaire élevé, les caractères de solubilité dans l'eau de leurs sels alcalins sont beaucoup moins nets. La simple extraction du produit saponifié par une solution aqueuse alcaline ne permet pas une bonne séparation, les sels des acides restant partiellement en solution avec l'insaponifiable dans les différents solvants utilisés.

Une autre technique a été signalée par Savidan (49). Elle est basée sur la salification des acides dissous dans un solvant organique par passage sur une colonne d'adsorbant alcalin. Le composé le plus intéressant est le carbonate de sodium anhydre: il fixe les acides sous forme de sels de sodium et, de plus, a des propriétés adsorbantes très faibles qui permettent d'éluer facilement la fraction insaponifiable.

Cette méthode nous a donné d'excellents résultats. Il est toutefois nécessaire d'opérer à chaud: la cire de Gascardia, constituée d'alcools et d'acides à haut poids moléculaire est en effet pratiquement insoluble à froid dans tous les solvants habituels y compris le benzène et le chloroforme alors qu'à chaud elle est assez soluble dans ces deux derniers solvants.

2°/ Technique utilisée

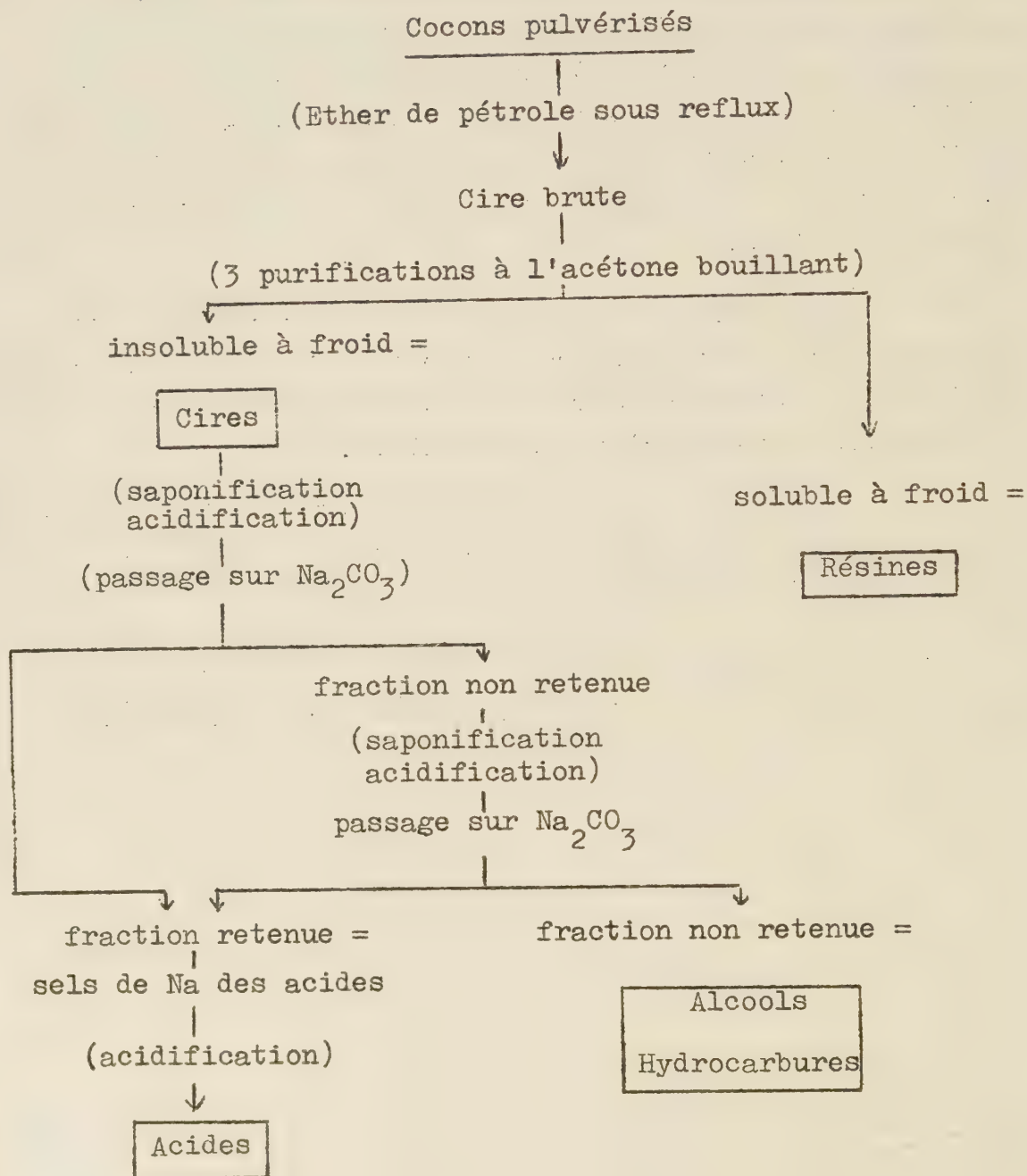
Le produit de la saponification acidifié par l'acide sulfurique est lavé à l'eau jusqu'à neutralité; les eaux de lavage sont utilisées pour la recherche des acides volatils tandis que le reste des cires est dissous dans le chloroforme puis passé sur une colonne de carbonate de sodium maintenu à 56°. Les acides sont retenus alors que les hydrocarbures et les alcools sont élués.

Le spectre infra-rouge de cette fraction neutre présentant encore une bande carbonyle à 1741 cm^{-1} , nous l'avons saponifiée à nouveau, et après un nouveau passage sur carbonate la séparation alcools-acides est complète.

La colonne de carbonate est alors dissoute dans l'eau, les acides gras sont libérés de leurs sels par acidification et séparés par filtration sur Büchner .

Le Tableau VI résume les opérations d'extraction et de fractionnement des cires de Gascardia Madagascariensis.

TABLEAU VI

Extraction et fractionnement des cires de Gascardia

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES

1. Extraction des cires

1 Kg de cocons est broyé au mixer et chauffé sous reflux avec 1,5 litre d'éther de pétrole (Eb. 50°-70°) pendant quelques heures; après filtration à chaud le résidu est repris 3 fois par 1 litre de solvant; le dernier liquide d'extraction ne contient pratiquement plus de cires. La distillation de l'éther de pétrole laisse les cires brutes, solide jaune collant ayant une forte proportion de résines.

Ces cires brutes (300 g) sont chauffées sous reflux pendant 1 heure avec 2 litres d'acétone qui dissout les substances non cireuses, pigments et résines : à 0° il précipite un solide blanc séparé par filtration sur Büchner. Ce précipité est repris 2 fois par l'acétone, le dernier filtrat est alors incolore.

Le précipité séché sous vide est une poudre blanche qui constitue les cires (88 g) tandis que la solution acétonique distillée abandonne 192 g de résines.

2. Fractionnement des cires

1°/ Saponification

25 g de cires dissoutes à chaud dans 250 ml de benzène sont chauffés sous reflux pendant 24 heures avec 250 ml de potasse méthanolique à 10 %. Les solvants sont distillés sous courant d'azote. Le résidu additionné de 150 ml d'eau et acidifié par H_2SO_4 concentré est chauffé au bain-marie. La croûte solide qui se forme par refroidissement à la surface du liquide est alors séparée et lavée plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage soient neutres.

Le produit de la saponification séché sous vide est une poudre blanc grisâtre (23,3 g).

2°/ Recherche des acides volatils

La phase aqueuse pourrait contenir des acides volatils: la présence de ces acides, assez rare dans le cas des cires, a cependant été signalée par Savidan dans la cire d'alfa (49). La technique employée est celle de Osteux, Guillaume et Laturaze (141). La phase aqueuse obtenue à partir de 25 g de cires saponifiées est additionnée de 10 ml de H_2SO_4 concentré, 300 ml de sulfate de magnésium à 50 % et soumise à un entraînement à la vapeur d'eau. Le distillat est titré par NaOH N/10 en présence d'orthocrésol sulfone phtaléine en solution aqueuse à 1 % : on recueille 0,5 μ M d'acide pour 25 g de cires. Les acides volatils sont donc en quantité négligeable dans la cire de Gascardia Madagascariensis.

3°/ Séparation des fractions neutre et acide

Les cires saponifiées (23,3 g) sont dissoutes dans 800 ml de chloroforme et la solution est passée sur une colonne de Na_2CO_3 (100-250 mesh) maintenue à 56° par des vapeurs d'acétone. Après lavage de la colonne par 500 ml de chloroforme le solvant est évaporé et on recueille 12,5 g d'insaponifiable contenant encore des esters.

Ce mélange est à nouveau saponifié par la potasse méthanolique pendant 24 h, lavé à l'eau de la manière habituelle, dissous dans 500 ml de chloroforme et passé sur 80 g de Na_2CO_3 . On obtient ainsi 9,5 g d'insaponifiable, solide brun, d'apparence cireuse.

On dissout la partie supérieure de la colonne de Na_2CO_3 dans 1 litre d'eau chaude, la solution est acidifiée par HCl concentré et les acides gras précipitent. Après filtration

sur Büchner on lave plusieurs fois à l'eau chaude jusqu'à neutralité et on recueille 13,5 g d'acides qui se présentent comme une poudre incolore.

II. ETUDE DES HYDROCARBURES

A. RESULTATS OBTENUS

1. Généralités sur les hydrocarbures des cires

Les hydrocarbures des cires animales et végétales sont en général saturés à nombre impair d'atomes de carbone de C_{19} à C_{35} , tandis que des hydrocarbures ayant de 17 à 44 atomes de carbone, à la fois pairs et impairs, sont les principaux constituants des cires minérales. Les hydrocarbures éthyléniques sont rarement rencontrés dans les cires naturelles pourtant le cérotène $C_{26}H_{52}$ a été trouvé par Kono et Maruyama dans les cires de 2 cochenilles, Pulvinaria horii (142) et Icerya purchasi (143). Warth (144) signale aussi l'heptacosylène $C_{27}H_{54}$ dans la cire de Ceroplastes ceriferus et le mélène $C_{30}H_{60}$ dans la cire d'abeille, mais il est vraisemblable que ces composés ne sont pas présents à l'origine dans la cire, ils sont obtenus après distillation à température élevée et correspondent probablement à un mélange complexe d'hydrocarbures (145). Quelques alcane ramifiés appartenant principalement à la série iso ont aussi été mis en évidence dans diverses cires végétales (106) et spécialement dans les feuilles de tabac (104)(107).

Les cires des Coccidés déjà étudiées ne contiennent que quelques hydrocarbures impairs: l'hentriacontane a été trouvé chez Tachardina Theae (146) et Ceroplastes rubens (147) et l'heptacosane chez Brahmea japonica (37) associé avec le pentacosane chez Laccifer lacca (144)..

Chibnall et al. en 1954 (148) identifient les paraffines impaires de C_{21} à C_{35} dans la cire de pétales de rose tout en soupçonnant l'existence des composés pairs en très faible

quantité non décelés par leur méthode, hypothèse qui a été confirmée par la spectrographie de masse et la chromatographie gaz-liquide.

Mazliak (89) trouve dans la cire de carnauba des quantités égales d'hydrocarbures pairs et impairs de C_{19} à C_{35} . Le plus souvent à côté d'un ou de deux hydrocarbures impairs prédominants on trouve d'autres composés pairs et impairs, mais seulement à l'état de traces: ainsi l'hentriacontane domine dans la cire des feuilles de tabac (104) et le nonacosane dans la cire de pomme (88) alors qu'ils existent en proportions égales chez une graminée Panicum crusgalli (149).

2. Isolement des hydrocarbures de Gascardia

Les hydrocarbures ne constituant que 0,5 à 1 % des cires de Coccidés (37)(146) nous avons préparé une fraction de cires enrichie en paraffines en utilisant leur solubilité à froid dans l'éther de pétrole.

La partie des cires totales soluble dans l'éther de pétrole (40 %) est saponifiée 2 fois et le produit de la saponification est épuisé à l'éther de pétrole. L'extrait éthéropétrolique est repris par l'acétone qui dissout les impuretés résiniques.

3. Identification des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont purifiés par chromatographie sur colonne d'alumine d'activité II. La fraction principale, éluee par l'éther de pétrole, est distillée sous vide dans un tube à boules et après plusieurs recristallisations dans l'alcool absolu on obtient un composé blanc microcristallin, saturé au tétranitrométhane, $F. = 60^{\circ}$.

Le spectre infra-rouge est caractéristique des paraffines à longue chaîne (150): bandes à 2870, 1465 et 1375 cm^{-1} ,

doublet à $727-718\text{ cm}^{-1}$.

Le point de fusion est intermédiaire entre ceux de l'heptacosane et du nonacosane (40); il en est de même pour la distance réticulaire des cristaux aux rayons X : $d = 37,8\text{ Å}$.

Chibnall et al. (140) donnent les caractéristiques, points de fusion et distances réticulaires, des mélanges de ces 2 hydrocarbures en différentes proportions. En comparant leurs données avec nos résultats on conclut à un mélange des 2 hydrocarbures en C_{27} et C_{29} dans la proportion 3-1 (Tableau VII). L'analyse est en bon accord avec celle des hydrocarbures $C_{27}H_{56}$ et $C_{29}H_{60}$:

Calculé %	$C_{27}H_{56}$	C	85,17	Trouvé %	C	85,17
		H	14,83		H	14,86
	$C_{29}H_{60}$	C	85,20			
		H	14,80			

TABEAU VII

Hydrocarbures		Point de fusion	Distance réticulaire en Å. (forme A)
% $C_{27}H_{56}$	% $C_{29}H_{60}$		
100	0	59°0	36,38
76	24	60°0	37,4
62	38	60°5	38,0
40	60	61°5	38,65
17	83	62°7	38,85
0	100	63°5	38,68
Gascardia madagascar		60°0	37,8

La chromatographie gaz-liquide de cette fraction d'hydrocarbures sur colonne de silicone rubber 20 % avec

programmation de 180° à 300° confirme la prédominance de l'heptacosane et du nonacosane dans des proportions voisines de celles indiquées précédemment, à côté de petites quantités de paraffines paires et impaires de C_{25} à C_{31} (fig. 1).

$$C_{25} = 3,4 \%$$

$$C_{26} = 1,4$$

$$C_{27} = 72,0$$

$$C_{28} = 2,2$$

$$C_{29} = 20,0$$

$$C_{30} = 0,0$$

$$C_{31} = 1,0$$

Les hydrocarbures de Gascardia Madagascariensis qui constituent 0,6 % des cires totales contiennent donc toute la série des hydrocarbures saturés de C_{25} à C_{31} , $C_{27}H_{56}$ et $C_{29}H_{60}$ étant les composés les plus abondants.

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES

1. Isolement des hydrocarbures

120 g de cires sont dissous à l'ébullition dans 1 litre d'éther de pétrole (55°-70°) puis abandonnés à 0° pendant quelques heures : un précipité blanc, floconneux est séparé par filtration sur Büchner et repris une deuxième fois par 500 ml d'éther de pétrole à l'ébullition. Les deux filtrats sont réunis, le solvant distillé et le résidu sec, constitue 50 g de fraction cireuse enrichie en hydrocarbures.

50 g de cires solubles à froid dans l'éther de pétrole sont dissous dans 500 ml de benzène et saponifiés pendant 13 heures

sous reflux par 500 ml de potasse méthanolique à 10 %. Les solvants sont évaporés et le résidu est additionné d'eau distillée puis acidifié à chaud par l'acide chlorhydrique concentré. Le produit de la saponification est extrait par le chloroforme et les phases aqueuse et chloroformique sont décantées à chaud. Après plusieurs lavages à l'eau jusqu'à neutralité la solution chloroformique est séchée sur Na_2SO_4 et le solvant évaporé.

La partie soluble dans le chloroforme qui contient l'insaponifiable et des acides gras à haut poids moléculaire est traitée sous reflux par 750 ml d'éther de pétrole pendant une heure. La solution est laissée une nuit à la température ambiante et le précipité filtré sur Büchner.

Après évaporation du solvant on obtient 9 g d'un produit qui est soumis à une deuxième saponification par 100 ml de potasse méthanolique à 5 % pendant 12 heures. On acidifie et on extrait par le mélange chloroforme-eau comme précédemment et la partie soluble dans le chloroforme est reprise par l'éther de pétrole.

L'extrait éthéro-pétrolique est traité 3 fois par 250 ml d'acétone pour éliminer les résines encore présentes et on obtient finalement 700 mg d'hydrocarbures.

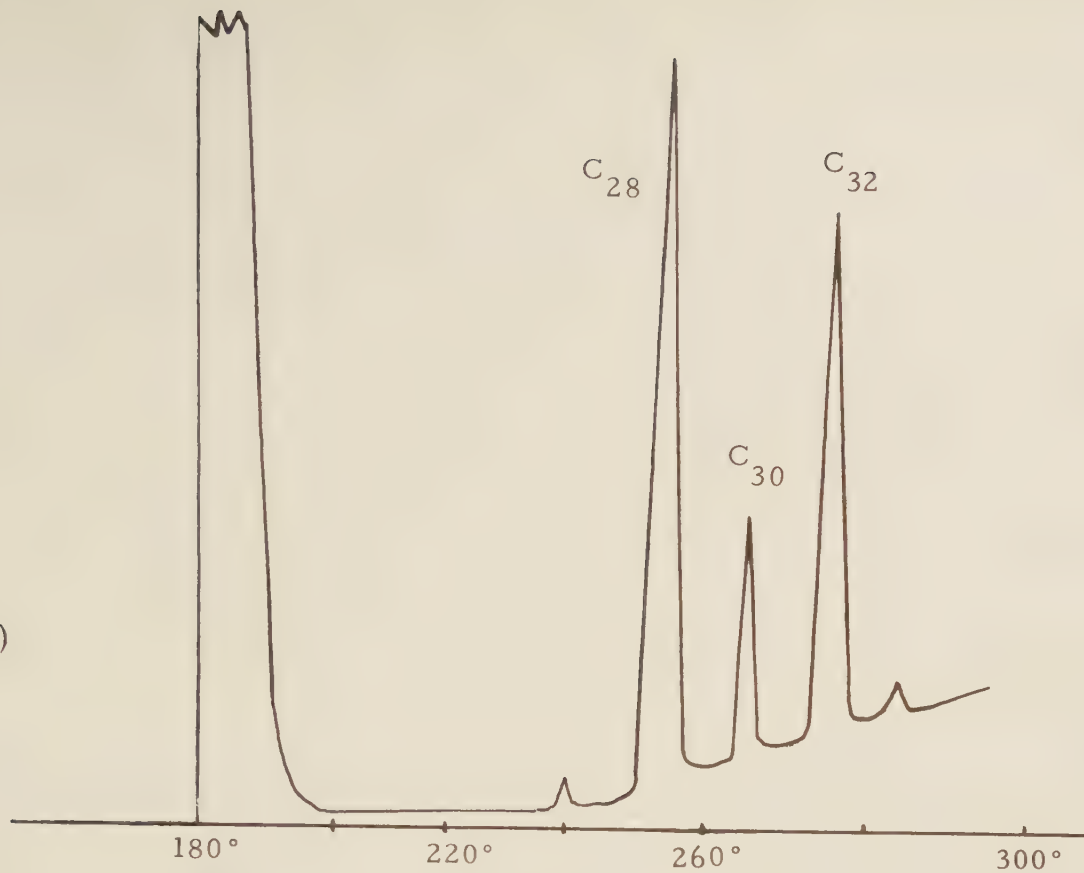
2. Identification des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont chromatographiés sur colonne d'alumine.

Chromato. N° 1

Hydrocarbures	700 mg
Alumine activité II	20 g
Elution par fractions de	25 ml

b)



a)

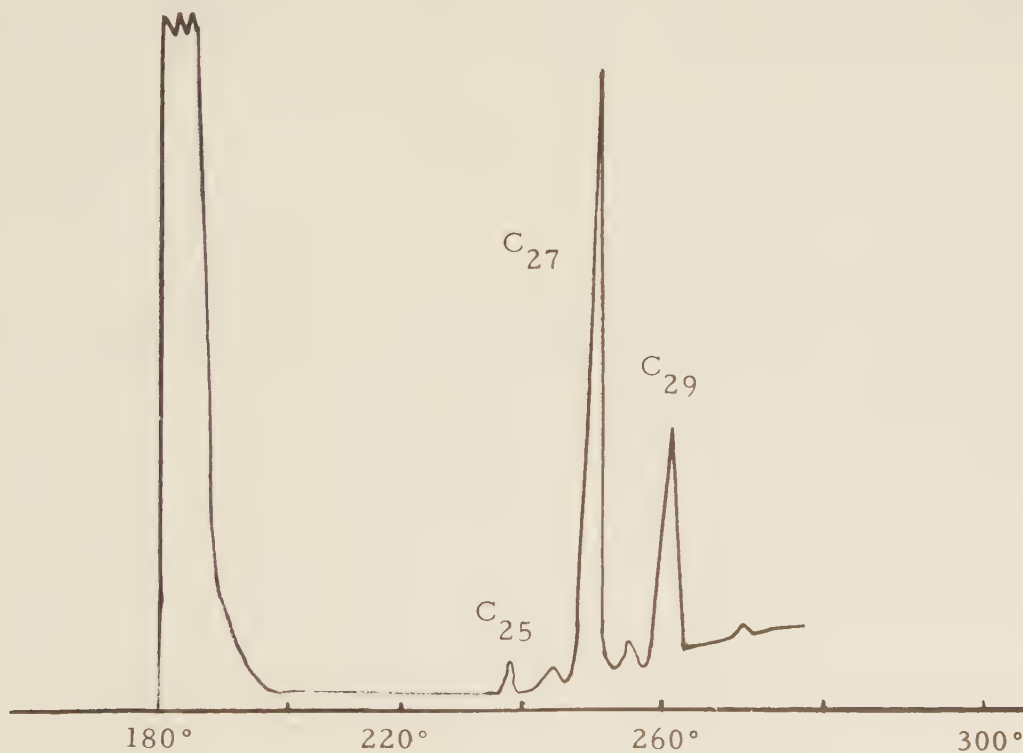


Fig. 1. a) Chromatogramme des hydrocarbures de *Gascardia madagascariensis* sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 180° à 300°.
b) Chromatogramme du mélange témoin octacosane + dotriacontane dans les mêmes conditions.

1.	Ether de pétrole	259 mg
2.	"	138
3.	"	4
4.	"	1
5.	"	1
6.	"	10
7-10.	"	0
11.	Benzène	12
12.	"	7
13.	"	2
14.	"	0
15.	"	1
Total		435 mg

Les éluats 1 et 2 (F.59°) sont réunis et distillés dans un tube à boules sous 10 mm Eb. 205°.

Le produit distillé est recristallisé deux fois dans l'alcool absolu et présente les caractéristiques suivantes:

F.	60°	Distance réticulaire :	37,8 Å
.. Analyse %	C	85,17	
	H	14,86	

Les hydrocarbures sont dissous à 50° dans le dioxanne distillé et séparés et identifiés par chromatographie gazeuse.

III. ETUDE DES ALCOOLS

A. RESULTATS OBTENUS

1. Généralités sur les alcools des cires

L'insaponifiable des cires contient essentiellement des hydrocarbures et des alcools, ces derniers, libres ou estérifiés, représentant généralement la partie la plus importante, puisqu'ils peuvent constituer jusqu'à 80 % des cires.

Quelques stérols existent dans des cires d'origine animale comme la cire de laine (151) et le cholestérol a été trouvé dans une cire d'insecte, la cire du criquet Anabrus simplex(83), mais les alcools aliphatiques à haut poids moléculaire, le docosanol et ses homologues supérieurs sont les plus répandus et représentent des éléments constants des cires.

La controverse quant à la parité ou l'imparité des alcools a été résolue en 1954 lorsque Brown et Young (77) ont conclu à la suite de leur étude par spectrométrie de masse de la cire des cheveux que les alcools impairs constituaient de 0,5 à 7,0 % des alcools des cires mais que les homologues pairs étaient toujours les plus importants, principalement l'hexacosanol ($C_{26}H_{53}OH$) et le triacontanol ($C_{30}H_{61}OH$).

A côté des alcools normaux à chaîne droite on trouve quelquefois des alcools de la série iso en particulier l'alcool isocérylique qui a été signalé dans les cires de deux Coccidés, Icerya purchasi (143) et Cerococcus muratae (144). De rares alcools secondaires existent dans quelques cires végétales et récemment le celidoniol (10-nonacosanol) a été isolé et caractérisé dans Chelidonium majus (152). Enfin la coccérine, cire secrétée par Dactylopius cacti, contient l'alcool coccérylique

auquel Beeker en 1931 (153) attribue la structure d'un glycol $C_{32}H_{64}(OH)_2$ mais identifié par Chibnall et al. (154) à un céto-alcool, le 15-cétotétratriacontanol; c'est un alcool cétonique de la même série, le 17-cétohexatriacontanol qui a été trouvé dans la cire de Pinus strabi (155).

Sauf quelques rares exceptions les alcools primaires aliphatiques à chaîne droite sont donc les constituants les plus importants des cires d'insectes.

2. Séparation des différents alcools de Gascardia

La fraction obtenue après saponification des cires et passage sur carbonate de sodium constitue 40 % du produit initial; elle se présente comme un solide brun, F. 68°-73°. Par chromatographie à chaud sur colonne d'alumine d'activité II selon la technique de Murray et Schoenfeld pour les alcools de la cire de carnauba (61) 2 fractions principales sont séparées dans les proportions suivantes :

<u>Fraction</u>	<u>Eluant</u>	<u>% de l'insapo.</u>
I	Benzène	41 %
II	Benzène-alcool 96° 1-1	32 %

3. Etude de la fraction I : Identification des alcools primaires à chaîne droite.

La fraction I est recristallisée plusieurs fois dans le benzène. C'est un solide blanc, F. 77°, saturé au tétranitrométhane. L'analyse élémentaire est proche de celle de l'hexacosanol $C_{26}H_{54}O$, cependant la valeur trouvée pour (C)- CH_3 est supérieure à la valeur théorique :

(C)- CH_3	trouvé %	5,12	calculé %	3,93
-------------	----------	------	-----------	------

Il est possible que nous soyons en présence d'un mélange d'alcools

primaires à chaîne droite et ramifiée et d'alcools secondaires ; le spectre infra-rouge présente en effet à côté d'une forte bande -OH caractéristique des alcools primaires à 1060 cm^{-1} une bande plus faible à 1120 cm^{-1} correspondant à l'absorption des alcools secondaires (fig. 2).

La séparation des composés à chaîne droite et des composés ramifiés peut être réalisée par l'intermédiaire des complexes avec l'urée (156)(157)(158): les molécules à chaîne droite donnent facilement de tels complexes alors que la présence d'une chaîne latérale supprime cette possibilité. Pour séparer aussi les alcools secondaires éventuellement présents nous avons utilisé les esters acétiques, les acétates des alcools primaires donnent un complexe avec l'urée contrairement aux acétates des alcools secondaires puisqu'ils possèdent une ramification.

La méthode suivie inspirée d'une technique décrite par Sumerwell pour la séparation des mélanges d'acides gras(154) consiste en épuisements successifs des acétates par des solutions saturées d'urée. Elle permet d'obtenir un complexe cristallisé qui, après acidification et extraction au chloroforme, donne 83 % d'un composé non ramifié. Celui-ci est chromatographié sur alumine et le produit recueilli, blanc, microcristallin, F. $61^{\circ}5$, présente les caractéristiques de l'acétate d'hexacosanyle $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$. La saponification redonne un alcool primaire F. 78° .

Analyse :

Trouvé % C	81,82	Calculé % $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$	C	81,60
H	14,26		H	14,22
(C)- CH_3	3,98		(C)- CH_3	3,93

Une réduction par l'acide iodhydrique et le phosphore rouge du produit saponifié, suivi d'un traitement à la poudre de zinc en milieu chlorhydrique, conduit à un solide blanc qui est purifié par chromatographie sur alumine. L'hexane élue un hydrocarbure F. $57^{\circ}5$, F. théorique pour $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$, $56^{\circ}5$.

Ces résultats sont en faveur de l'hexacosanol avec cependant des points de fusion pour l'alcool et les dérivés légèrement différents des points de fusion théorique :

alcool	78°	pour	79°5	théorique
acétate	61°5	"	60°	"
hydrocarbure	57°5	"	56°5	"

Il est donc vraisemblable qu'il existe un certain pourcentage des homologues supérieurs et inférieurs en mélange avec l'hexacosanol.

La chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Silicone rubber avec programmation de 185° à 300° confirme cette hypothèse puisque l'analyse qualitative et quantitative du chromatogramme (fig. 3) nous donne les résultats suivants :

C ₂₄	=	4,6 %
C ₂₆	=	72,0 %
C ₂₈	=	11,6 %
C ₃₀	=	5,9 %
C ₃₂	=	5,9 %

L'hexacosanol semble être un constituant constant chez les cires des Coccidés, il a été en effet trouvé sous forme libre ou estérifiée chez de nombreuses espèces: les Ceroplastes (160) (42)(54), Ericerus pela (161) , Pulvinaria horii (142) , Icerya purchasi (143), Laccifer lacca (144), Tachardina Theae (146), Unaspis yanonensis (160) et Cerococcus muratae (162), il est donc normal de le retrouver chez Gascardia madagascariensis.

4. Etude de la Fraction II

Le mélange benzène-éthanol 1-1 élue une fraction pâteuse, brune, insaturée, à faible pouvoir rotatoire. Des essais de purification par chromatographie sur acide silicique-célite et sur alumine ne donnent aucune séparation satisfaisante. D'autre part le spectre infra-rouge montre de nombreuses bandes

très étalées.

Il s'agit probablement d'une fraction résinique complexe, représentant des impuretés des cires, que nous n'avons pas étudiée davantage.

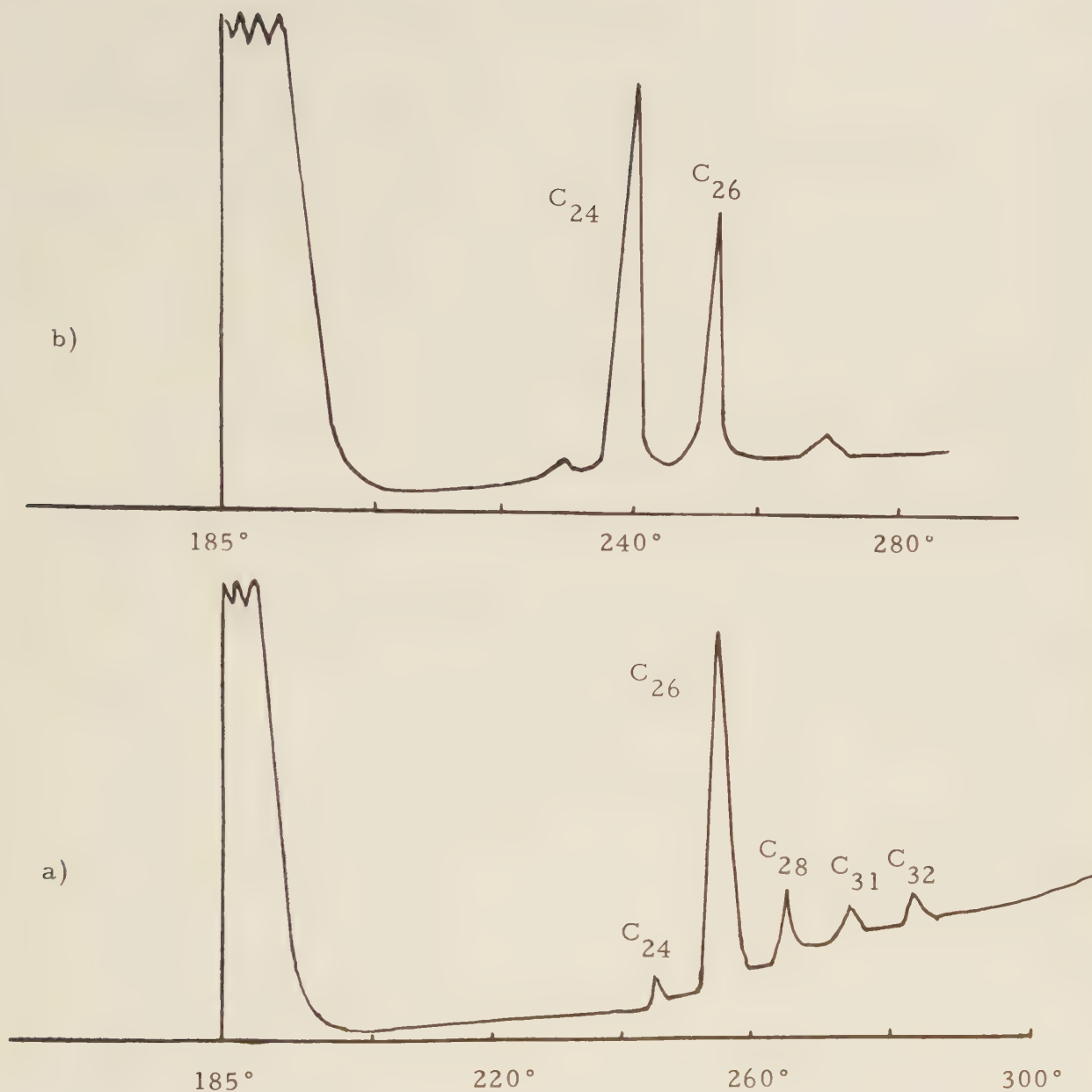


Fig. 3. a) Chromatogramme des alcools primaires de Gascardia madagascariensis sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 185° à 300°.
 b) Chromatogramme du mélange témoin tétracosanol + hexacosanol dans les mêmes conditions.

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES

1. Séparation des différents alcools

L'insaponifiable des cires est chromatographié sur colonne d'alumine II à 56°.

Chromato. N° 2

	Insaponifiable	18 g
	Alumine	360 g
	Elution par fractions de	250 ml
1.	Benzène	321 mg
2.	"	414
3.	"	5713
4.	"	872
5.	"	326
6.	"	98
7.	Benzène-Ethanol 9: 1	43
8.	Benzène-Ethanol 1: 1	21
9.	"	4058
10.	"	500
11.	"	174
12.	"	188
13.	"	147
14.	"	134
15.	"	147
16.	"	177
17.	"	144
18.	"	41
19.	"	42
20.	Chloroforme-ac.acétique 1 %	21
21.	"	363
22.	"	489
23.	"	202
24.	"	154
25.	"	141
26.	"	17
27.	Chloroforme-ac.acétique 5 %	213
28.	"	513
29.	"	256

Total : 15,929 g

Les éluats 2 à 6 réunis forment la fraction I

" " 9 à 19 " " " II

2. Identification des alcools primaires normaux

1°/ Acétylation et dosage des groupements hydroxyles

700 mg de la fraction I sont acétylés au bain-marie bouillant par 3 ml d'anhydride acétique-pyridine 1: 3 . Après 45 minutes on ajoute quelques ml d'eau, et 10 ml de butanol. L'acide acétique formé est dosé par la soude alcoolique 0,490 N en présence d'un indicateur mixte (ortho-crésol sulfone phtaleine-thymol sulfone phtaléine) (163).

Trouvé -OH % 4,87 correspondant à un poids moléculaire de 350 pour un monoalcool (P.M. $C_{24}H_{50}O$ 354)

2°/ Séparation des différents acétates

On prépare une solution saturée d'urée dans le mélange acétate d'éthyle-méthanol 2: 1 à 37°, car à température ordinaire le dérivé acétylé est insoluble dans ce solvant. On place dans 5 erlens 2 g d'urée afin de maintenir la solution saturée en urée après formation du complexe.

Le mélange d'acétates (850 mg) est placé dans le 1er erlen (0) avec 70 ml de la solution d'urée, chauffé jusqu'à dissolution complète du produit puis abandonné à 37°. Après une nuit de repos, un précipité cristallisé s'est formé, on décante le liquide qui est transvasé dans le 2^e erlen (1) et on rajoute 60 ml de solution d'urée au précipité. Après 24 h à 37° le liquide surnageant de l'erlen n°1 est décanté dans le n°2, celui du n°0 dans le n°1 et on rajoute 60 ml de solution d'urée dans le 1er erlen. On répète 2 fois la même opération.

Les précipités sont repris dans une ampoule à décanter par 70 ml de HCl N/2 et 100 ml de $CHCl_3$, on opère de même avec les filtrats. Les précipités fournissent les acétates à chaîne droite et les filtrats les composés à chaîne ramifiée.

<u>précipité n°</u>	<u>poids d'acétate</u>	<u>filtrat n°</u>	<u>poids d'acétate</u>
0	533 mg	0 et 1	0 mg
1	82	2	2,5
2	6	3	9
3 et 4	0	4	35

On recueille ainsi le dérivé acétylé d'un alcool primaire à chaîne droite à côté de faibles quantités d'acétate à chaîne ramifiée.

3°/ Etude de l'acétate à chaîne droite

Les précipités n°0 et n°1 sont purifiés par chromatographie sur alumine.

Chromato. N°3

acétate	615 mg
alumine II	12 g
élution par fractions de	25 ml
1 Hexane - Benzène 4 : 1	322 mg
2 "	174
3 "	73
4 "	21
Total	590 mg

Les éluats n°1 et 2 sont réunis. Leur spectre infra-rouge ne possède plus les bandes -OH mais la bande caractéristique des esters acétiques à 1050 et 1240 cm^{-1} . Après 2 recristallisations dans l'acétate d'éthyle le produit présente les caractéristiques suivantes :

F. 61°5	$\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$ authentique	F. 60°
I.S. 132		I.S. 132

Analyse trouvé % C 78,30
H 13,26

Calculé % C 79,18
H 13,29

4°/ Saponification de l'acétate

450 mg d'acétate dissous dans 5 ml de benzène sont saponifiés par 3 ml de potasse alcoolique 0,5 N pendant 1 heure. Après acidification le composé obtenu est extrait par 60 ml de CHCl_3 .

Le solvant est évaporé, on obtient un produit blanc dont le spectre infra-rouge est celui d'un alcool primaire et qui après 3 recristallisations dans l'acétate d'éthyle peut être identifié à l'hexacosanol.

F. 78°	$\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$ authentique	F. 79°5
Analyse trouvé %	Calculé %	
C 81,82	C 81,60	
H 14,26	H 14,22	
(C)- CH_3 3,98	(C)- CH_3 3,93	

5°/ Réduction par IH + P

167 mg de l'alcool précédent sont mis sous reflux pendant 24 h avec 5 ml d'acide iodhydrique à 57 % ($d = 1,7$) et 60 mg de phosphore rouge. Après refroidissement le mélange est repris par l'eau et le benzène. La solution benzénique est lavée à l'eau, par une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium à 5 %, puis de nouveau à l'eau, et elle est séchée sur sulfate de sodium.

Le benzène est évaporé et le résidu, dissous dans 10 ml de méthanol + 5 ml d'eau est mis sous reflux pendant 4 h en présence de poudre de zinc (160 mg) et d'acide chlorhydrique concentré (2,5 ml). Le produit de la réaction est additionné d'eau et repris par l'hexane qui extrait 102 mg d'un solide blanc que l'on chromatographie sur alumine.

Chromato. N°4

Alcool réduit	102 mg
Alumine II	2 g
Elution par fractions de	15 ml

1.	Hexane	55 mg
2.	"	1
3.	"	1
4.	Benzène	12
5.	"	1
Total		70 mg

L'éluat n°1 est reprécipité 2 fois dans l'éthanol F. 57°5.
F. théorique de l'hexacosane 57°.

6°/ Chromatographie gaz-liquide des alcools

L'alcool obtenu par saponification de l'acétate est dissous à 50° dans le dioxanne et introduit sur colonne de Silicone-rubber 20 % sur Fire-brick 60-80 mesh programmé de 185 à 310°. Une chromatographie dans les mêmes conditions est réalisée avec le tétracosanol et l'hexacosanol authentiques.

IV. ETUDE DES ACIDES NON HYDROXYLES

A. RESULTATS OBTENUS

1. Généralités sur les acides des cires

Les alcools trouvés dans les cires sont généralement estérifiés par des acides gras saturés à haut poids moléculaire. Nous avons déjà vu que la structure de ces acides avait fait l'objet de nombreuses controverses en particulier celle de l'acide cérotique isolé de la cire d'abeille et de la cire de Céroplastes ceriferus Chap.II p.15). Ce n'est qu'en 1947 que Weitkamp et al. (58) étudiant les acides du sébum des cheveux signalent pour la première fois la série ininterrompue des acides pairs et impairs de C_7 à C_{22} , les acides à nombre pair d'atomes de carbone étant toujours en proportion beaucoup plus grande.

Tous les termes de la série normale saturée ont été trouvés dans les cires d'insectes et en particulier chez les Coccidés, depuis l'acide dodécanoïque chez Unaspis yanonensis (160) jusqu'à l'acide hexatriacontanoïque chez Ceroplastes rubens (144). Mais l'acide hexacosanoïque est de loin le plus répandu puisqu'il a été mis en évidence dans les cires de plusieurs Coccidés: Cerococcus muratae (162), Ceroplates ceriferus (42)(54), Ericerus pela (161)(164), Icerya purchasi (143), Unaspis yanonensis (160), Pulvinaria horii (142) et Pseudolacaspis pentagona (165).

A côté de ces acides saturés à chaîne droite on a trouvé dans les cires d'insectes des acides éthyléniques chez le criquet (83) et chez Tachardina Theae (146) et un céto-acide en C_{32} , l'acide coccérique, sécrété par Dactylopius cacti (154) et Tachardina Theae (146). Certaines cires végétales d'origine exotique comptent parmi leurs constituants quelques acides dicarboxyliques (166)(167)(168) et les hydroxyacides sont souvent

isolés des cires animales et végétales.

Bougault et Bordier en 1909 (30)(31) puis Fujita et Yoshikawa (169) isolent 2 ω hydroxyacides en C_{12} et C_{16} dans les cires de conifères, alors que l'acide phélonique, dont la structure a été récemment trouvée (170) se trouve dans la cire de plusieurs végétaux. Enfin Murray et Schoenfeld (63) ont isolé toute la série des ω hydroxyacides de C_{18} à C_{30} dans la cire de carnauba.

Il existe aussi des acides α hydroxylés dans la cire de laine (55)(171)(172) et dans les lipides du cerveau (173)(174) (175). Parmi les cires d'insectes une série d'hydroxyacides de C_{12} à C_{32} a été trouvée dans la cire d'abeille (101)(119) et Kono et Maruyama signalent des acides dihydroxylés en C_{12} et C_{14} dans la cire de la cochenille Tachardina Theae (146).

Les acides gras saturés à haut poids moléculaire sont donc des constituants habituels des cires auxquels s'ajoutent parfois des acides éthyléniques, cétoniques, dicarboxyliques ou hydroxylés.

2. Fractionnement des acides de Gascardia

Les acides isolés de Gascardia madagascariensis, après dissolution dans l'eau de la colonne de carbonate de sodium et acidification, ont l'aspect d'une poudre blanche, F. 90°-95° et constituent 60 % des cires. Ils sont méthylés par le benzène-méthanol en milieu acide avant d'être chromatographiés sur alumine d'activité II selon la technique de Clark et al. (176) utilisée par Murray et Schoenfeld (62) pour la cire de carnauba. On obtient deux fractions.

<u>Fraction</u>	<u>Eluant</u>	<u>% des esters récupérés</u>
I	Ether-pétrole-Benzène 1-1	53 % (ou 40 % de la chromatogramme)
II	Benzène-Méthanol 9-1	47 % (ou 35 % de la chromatogramme)

Une partie des esters (25 %) s'est hydrolysée sur la colonne et les acides formés sont retenus sur l'alumine.

Après plusieurs recristallisations dans l'acétate d'éthyle le spectre infra-rouge de la fraction I montre les bandes des esters méthyliques à 1741, 1250, 1190, 1170, et 870 cm^{-1} (fig.4) auxquelles s'ajoutent pour la fraction II les bandes -OH à 3400, 1120 à 1060 cm^{-1} (fig.5). Les cires de Gascardia contiennent donc des acides gras non hydroxylés (Fraction I) et des hydroxyacides (Fraction II).

3. Etude des acides non hydroxylés par la méthode de Piper et Chibnall.

1°/ Résultats obtenus

La fraction I est saturée au tétranitrométhane: F.72°5.

La réduction de cet ester par l'hydrure de lithium et d'aluminium conduit à un alcool primaire dont le point de fusion est intermédiaire entre celui de l'hexacosanol et celui de l'octacosanol :

F. trouvé: 82°5	F. théorique $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$	79°5
	$\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$	83°5

La saponification de l'ester fournit un acide qui, recristallisé dans l'acétone, a un point de fusion proche de celui de l'acide hexacosanoïque:

F. trouvé: 86°5	F. théorique $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$	83°5
	$\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_2$	88°

P.M. (acidimétrie) 469

L'analyse de cet acide aux rayons X donne des résultats intéressants. L'acide gras cristallise sous la forme B; un diagramme au cristal tournant donne pour l'acide gras une distance réticulaire de $81,6\text{ Å} \pm 1,2\text{ Å}$. Fondu sur plomb il donne un

diagramme avec des raies fines et la distance réticulaire des sels de plomb est $88,1 \text{ \AA} \pm 0,4 \text{ \AA}$.

Ne possédant pas d'acides témoins supérieurs à C_{26} nous avons interprété ces résultats par comparaison avec les valeurs théoriques données par Piper et Chibnall (41) et pour les sels de plomb par extrapolation de la courbe obtenue avec les acides C_{16} à C_{26} .

Le tableau VIII indique les distances réticulaires mesurées en angströms pour la forme B des acides gras pairs et pour leurs sels de plomb.

Tableau VIII

Distance réticulaire des acides gras et de leurs sels de plomb

	Acides gras forme B selon Piper et Chibnall	Sels de plomb par extrapolation
acide C_{32}	76,1	85,4
acide C_{34}	80,4	90,0
acide C_{36}	85,3	95,2
acide fract. I	$81,6 \pm 1,2$	$88,1 \pm 0,4$

2°/ Interprétation des résultats

L'ensemble de ces résultats indique que nous sommes en présence d'un mélange d'acides gras homologues; nous avons utilisé les travaux de Piper et Chibnall (41) sur les caractéristiques des mélanges d'acides et d'alcools à haut poids moléculaire pour en déterminer la composition.

Le tableau IX rapporte les points de fusion et distances réticulaires des acides, des alcools et des esters méthyliques authentiques ainsi que les caractéristiques de la fraction I et de ses dérivés.

TABLEAU IX

	Points de fusion			Dist. réticulaire en Å des acides (forme B)
	Alcools	Acides	Ester me	
C ₂₆	79°5	88°0	63°5	62,0
C ₂₈	83°5	91°0	67°5	66,8
C ₃₀	86°5	94°0	71°0	71,4
C ₃₂	89°5	96°0	75°0	76,1
C ₃₄	92°0	98°5	78°0	80,4
Fraction I	82°5	86°5	72°5	81,6 ± 1,2

Piper et Chibnall montrent qu'un mélange d'acides gras cristallise sous la forme B de l'acide à plus haut poids moléculaire si cet acide représente 20 % ou plus du mélange; les distances réticulaires étant voisines de celles de l'acide tétratriacontanoïque l'homologue supérieur de la fraction I est en C₃₄.

Le point de fusion de l'ester, 72°5, peut laisser prévoir que le poids moléculaire moyen du mélange est proche de C₃₁ (F.théorique 71°2) puisque le point de fusion d'un mélange d'esters méthyliques est celui du composé de poids moléculaire moyen. Le poids moléculaire trouvé pour l'acide (par titrage acidimétrique) correspond aussi à une longueur de chaîne moyenne en C₃₁:

P.M. trouvé : 469	P.M. de C ₃₀ H ₆₀ O ₂	452
	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	467
	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	480

Enfin les analyses élémentaires conduisent également à une formule moyenne en C₃₁.

	Trouvé %	Calculé %	
Acides	C 79,78 H 13,21	$C_{31}H_{62}O_2$	C 79,76 H 13,39
Esters Me	C 80,09 H 13,44	$C_{32}H_{64}O_2$	C 79,93 H 13,42
Alcools	C 82,33 H 14,22	$C_{31}H_{64}O$	C 82,22 H 14,25

Piper et Chibnall constatent aussi que dans les mélanges ternaires sensiblement équimoléculaires le point de fusion des alcools est supérieur de 0°7 à 0°9 environ à celui de l'alcool fondant le plus bas et que le point de fusion des acides est inférieur de 3°6 à 4°7 à celui de l'acide fondant le plus bas. Si les mélanges ne sont pas équimoléculaires le point de fusion du mélange d'alcools ou d'acides tend à se rapprocher de celui du poids moléculaire moyen. Le point de fusion de l'alcool, dérivé de la fraction I, supérieur de 2°5 à celui de C_{26} , et le point de fusion de l'acide, inférieur seulement de 1°5 à celui de l'acide hexacosanoïque, montre que l'homologue le plus bas doit être en C_{26} .

La fraction I contient donc les acides $C_{26}H_{52}O_2$ et $C_{34}H_{68}O_2$ en assez grande proportion avec en plus faible quantité les homologues C_{30} ou C_{32} puisque la longueur de chaîne moyenne est C_{31} . La composition qualitative et quantitative est impossible à déterminer par cette seule méthode, d'autant plus qu'il ne faut pas exclure la présence éventuelle des acides pairs et impairs intermédiaires en pourcentage plus faible.

4. Etude des acides normaux par chromatographie gazeuse

Le complément nécessaire à l'identification des acides

gras normaux de la fraction I nous est donné par la chromatographie gaz-liquide des esters méthyliques sur colonne de Silicone rubber avec programmation de 130° à 320°.

Nous obtenons la composition suivante (fig. 6) :

$C_{16} = 0,4 \%$	$C_{28} = 4,4 \%$
$C_{18} = 0,1 \%$	$C_{30} = 5,8 \%$
$C_{20} = 0,1$	$C_{31} = \text{traces}$
$C_{22} = \text{traces}$	$C_{32} = 19,8 \%$
$C_{24} = 0,5$	$C_{33} = 0,1 \%$
$C_{26} = 26,0 \%$	$C_{34} = 39,5 \%$
$C_{36} = 3,2 \%$	

Il est intéressant de constater que la méthode de Piper et Chibnall se trouve vérifiée: les acides hexacosanoïque et tétratriacontanoïque constituent en effet 65,5 % du mélange, le troisième acide en quantité importante est l'acide dotriacontanoïque (19,8 %). Les analyses sont aussi en bon accord puisque le mélange correspond à une longueur de chaîne moyenne en C_{31} .

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES.

1. Méthylation et fractionnement des acides

10 g d'acides gras dissous dans 500 ml de benzène-méthanol 1:1 contenant 1 % d'acide sulfurique sont mis sous reflux pendant 20 heures dans un soxhlet contenant du sulfate de magnésium anhydre. La solution est reprise à chaud dans une ampoule à décanter par 400 ml d'eau et 200 ml de benzène. La couche benzénique contenant les esters méthyliques des acides gras est lavée jusqu'à neutralité puis séchée sur sulfate de sodium. Après distillation du benzène on recueille 9,650 g d'esters qui

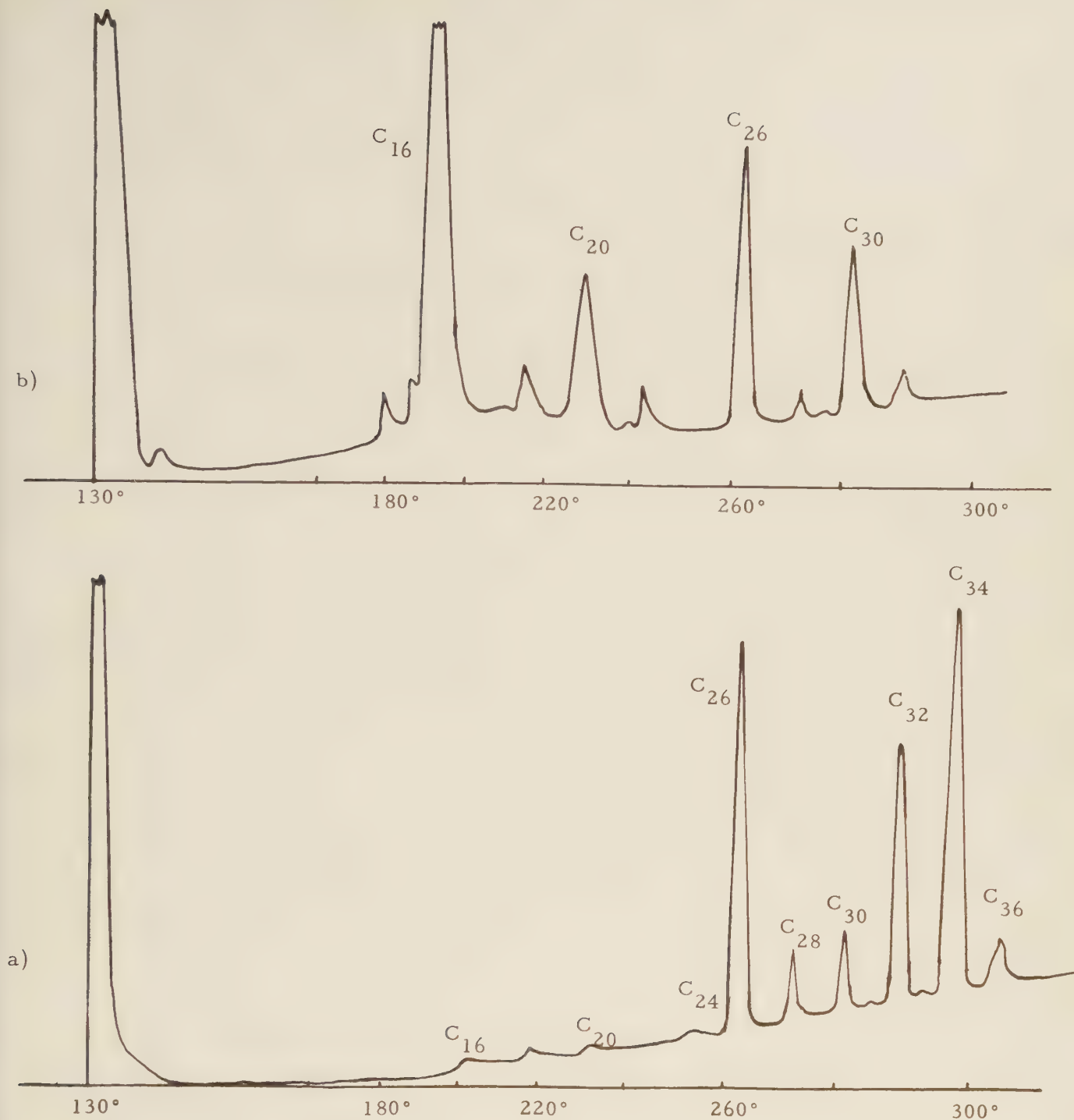


Fig. 6. a) Chromatogramme des esters méthyliques des acides non hydroxylés de *Gascardia madagascariensis* sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 130° à 320°.
 b) Chromatogramme des esters méthyliques des acides témoins C₁₆, C₂₀, C₂₆ et C₃₀ dans les mêmes conditions.

sont chromatographiés sur alumine à 56°.

Chromato. N°5

Esters méthyliques	:	9,650	g
Alumine activité II	:	220	g
Elution par fractions de	:	250	ml

I.	Ether de pétrole : benzène 1-1	95	g
2	"	2178	
3	"	770	
4	"	301	
5	"	48	
6	"	13	
7	"	23	
8	Benzène	17	
9	"	13	
10	"	16	
11	Benzène - méthanol 9:1	6	
12	"	3359	
13	"	210	
14	"	31	
15	"	19	
16	"	8	
17	Benzène - méthanol 1:1	19	
18	"	6	
19	Méthanol - chloroforme 1:1	9	
20	"	7	
21	Chloroforme - ac.acétique 1 %	18	
22	"	694	
23	"	272	
24	"	198	
25	"	159	
26	"	67	
27	"	50	
28	Chloroforme - ac.acétique 5 %	300	
29	"	65	
30	"	50	
31	"	48	

Total	<u>9,069</u>	g
-------	--------------	---

Les éluats 2 et 4 réunis forment la fraction I.

L'éluat 12 forme la fraction II.

2. Etude des acides non hydroxylés

1°/ Réduction par LiAlH_4

La réduction de l'ester méthylique est faite dans le tétrahydrofurane préalablement séché sur sodium. A 503 mg d'esters méthyliques dissous dans 40 ml de tétrahydrofurane, on ajoute une suspension de 450 mg de LiAlH_4 dans 10 ml du même solvant. Le mélange est maintenu dans un bain d'air à 40° et agité de temps en temps. Après 30 minutes l'excès de LiAlH_4 est détruit par 5 ml d'eau, puis on acidifie par H_2SO_4 3 N et on reprend par le chloroforme à chaud.

La solution chloroformique est séchée sur sulfate de sodium, le solvant est évaporé et on dissout le produit de la réduction dans 8 ml de benzène auquel on ajoute 8 ml de potasse méthanolique à 5 %. Après saponification, le mélange est acidifié repris par le benzène à chaud puis chromatographié sur alumine à 40°.

Chromato. N°6

Fraction I réduite et saponifiée	390 mg
Alumine activité II	8 g
Elution par fractions de	50 ml
1. Benzène	135 mg
2. "	234
3. "	0
Total	<u>369 mg</u>

L'éluat n°2, après 2 recristallisations dans l'acétate d'éthyle, est un produit incolore, F. 82°5. Le spectre infra-rouge est celui d'un alcool primaire saturé (apparition des bandes à 3400, 1120 et 1050 cm^{-1}).

2°/ Saponification et étude de l'acide

493 mg de la fraction I dissous dans 10 ml de benzène

sont traités pendant 9 heures sous reflux avec 10 ml de potasse méthanolique à 5 %. Les solvants sont évaporés et on ajoute 25 ml d'eau et de l'acide chlorhydrique 6N jusqu'à franche acidité. Au bain-marie bouillant les acides gras forment une couche liquide à la surface qui se solidifie à froid. L'eau est alors décantée et les acides sont lavés jusqu'à ce que les eaux de lavage soient neutres. Les acides en solution chloroformique sont séchés sur sulfate de sodium et le solvant évaporé: on obtient 464 mg d'acides gras.

Le produit de la saponification, après plusieurs recristallisations dans l'acétone, est une poudre incolore, F. 86°5, P.M. (par acidité) 469. Le spectre infra-rouge (fig. 7) est celui d'un acide saturé à longue chaîne (177).

L'analyse aux rayons X de l'acide gras fondu sur lame de verre donne un diagramme diffus dans lequel on ne voit que les ordres 3,5 et 7. Par contre le diagramme des sels de plomb est très net et on y distingue une vingtaine d'ordres. Les mesures des distances réticulaires sont faites par comparaison avec un diagramme étalon de mica muscovite dont la maille est connue avec une grande précision : $d_{002} = 9,974 \text{ \AA}$; les valeurs obtenues ainsi que leur interprétation ont déjà été indiquées précédemment. Enfin un chauffage progressif de l'acide gras de la température ambiante jusqu'à la fusion ne donne pas de variation de la grande distance réticulaire.

3°/ Chromatographie en phase gazeuse

Quelques milligrammes de la fraction I sont dissous à 50° dans le dioxanne et introduits à cette température sur la colonne. Les esters méthyliques témoins sont obtenus par méthylation avec le diazométhane des acides C_{16} - C_{20} - C_{26} et C_{30} du commerce.

V. ETUDE DES ACIDES HYDROXYLES

A. RESULTATS OBTENUS

Les acides de Gascardia madagascariensis, nous l'avons vu précédemment, comprennent à la fois des acides saturés de C_{16} à C_{36} et des hydroxyacides que nous nous proposons d'étudier maintenant.

Après une recristallisation dans l'acétate d'éthyle, la fraction éluee par le mélange benzène-méthanol 1:1 lors de la chromatographie des esters méthyliques totaux de Gascardia (chromato. N°5 page 67, Fraction II) se présente comme une poudre blanche saturée au tétranitrométhane, F. 91° , $[\alpha]_D = -2^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($CHCl_3$). L'analyse élémentaire correspond à $C_{34}H_{68}O_3$. Le dosage de $(C)-CH_3$ 2,70 %, (calculé pour $C_{34}H_{68}O_3$ 2,86) indique l'absence de ramifications. Le spectre infra-rouge (fig. 5) montre la présence d'une fonction alcool à côté de la fonction ester méthylique: il s'agit donc de l'ester méthylique d'un hydroxyacide.

1. Mise en évidence d'une fonction alcool secondaire

La fraction II présente tous les caractères des alcools secondaires.

L'acétylation est faite par le mélange anhydride acétique-pyridine suivie d'une extraction au chloroforme et d'une chromatographie sur colonne de trisilicate de magnésium-célite. Nous avons aussi utilisé l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium selon Kitagawa (178): après extraction au chloroforme on purifie l'acétate par chromatographie sur alumine. Le spectre infra-rouge (fig. 8) montre la disparition des bandes

acétyles à 1240 et 1030 cm^{-1} .

L'oxydation ménagée par l'anhydride chromique dans l'acétone suivie d'une purification par chromatographie sur alumine conduit à un cétoester, F. 86°, et la saponification donne un acide cétonique, F. 102°5.

Enfin la réduction par l'acide iodhydrique en présence de phosphore rouge de la fraction II préalablement saponifiée, suivie d'un traitement par le zinc en milieu chlorhydrique donne un acide non hydroxylé.

2. Longueur de la chaîne carbonée

Les nombreux essais de chromatographie en phase gazeuse des hydroxyesters ont été négatifs. A 350°, aucun pic n'est détecté sur le chromatogramme ce qui indique probablement une décomposition du produit à haute température.

Nous avons chromatographié les acides non hydroxylés obtenus précédemment par réduction avec le phosphore sur colonne de Silicone rubber à 280° (fig. 9). Nous avons un mélange de trois acides dans les proportions suivantes:

$$C_{30} = 8 \%$$

$$C_{32} = 39 \%$$

$$C_{34} = 53 \%$$

La détermination de la longueur de la chaîne carbonée a été faite également selon la technique de Downing et al. (101) qui consiste à transformer les hydroxyesters en hydrocarbures aisément chromatographiables. La fraction II est réduite par l'hydrure de lithium et d'aluminium, puis saponifiée; une filtration sur carbonate de sodium permet d'isoler un diol, F. 112°. Le spectre infra-rouge ne possède que les bandes -OH, les bandes -CO- ont disparu (fig. 10). L'acétylation de ce composé par l'anhydride acétique en présence de pyridine conduit à un composé,

F. 76°5, dont l'analyse correspond à la fraction initiale deux fois acétylée.

Calculé pour $C_{37}H_{72}O_4$, (CO)-CH₃ (pour 2) 5,16 %

Trouvé (CO)-CH₃ (pour 2) 5,19 %

Le spectre infra-rouge possède une très forte bande acétyle et pas de fonction -OH.

Le diol traité par l'acide iodhydrique et le phosphore rouge conduit à un ester iodhydrique, F. 79° qui est réduit par l'hydrure de lithium et d'aluminium; le produit de la réduction est saponifié et chromatographié sur alumine: l'hexane élue un composé incolore, F. 70°, son spectre infra-rouge est celui d'un alcane (fig. 11).

La chromatographie en phase gazeuse sur colonne de Silicone rubber avec programmation de 175° à 300° (fig. 12) indique qu'il s'agit d'un mélange de 3 hydrocarbures normaux en C₃₀, C₃₂, C₃₄, confirmant ainsi les résultats obtenus par chromatographie gaz-liquide des esters méthyliques.

La fraction II est donc un mélange de trois hydroxy-esters en C₃₀, C₃₂ et C₃₄, ces deux derniers étant nettement prédominants.

3. Position de la fonction hydroxyle

Les hydroxyacides isolés de Gascardia madagascariensis ne sont pas ω hydroxylés puisqu'ils possèdent un atome de carbone asymétrique $[\alpha]_D = -2 \pm 0,5$. D'autre part l'oxydation ménagée de la fonction alcool par l'anhydride chromique dans l'acétone ne donne pas un diacide mais un acide-cétone.

Par saponification, le cétoester donne un céto-acide, P.M..500 par titrage acidimétrique, ce qui exclut la position β pour la fonction cétone, le β céto-acide obtenu par saponification de l'ester aurait dans ce cas donné une méthyl-cétone par décarboxylation.

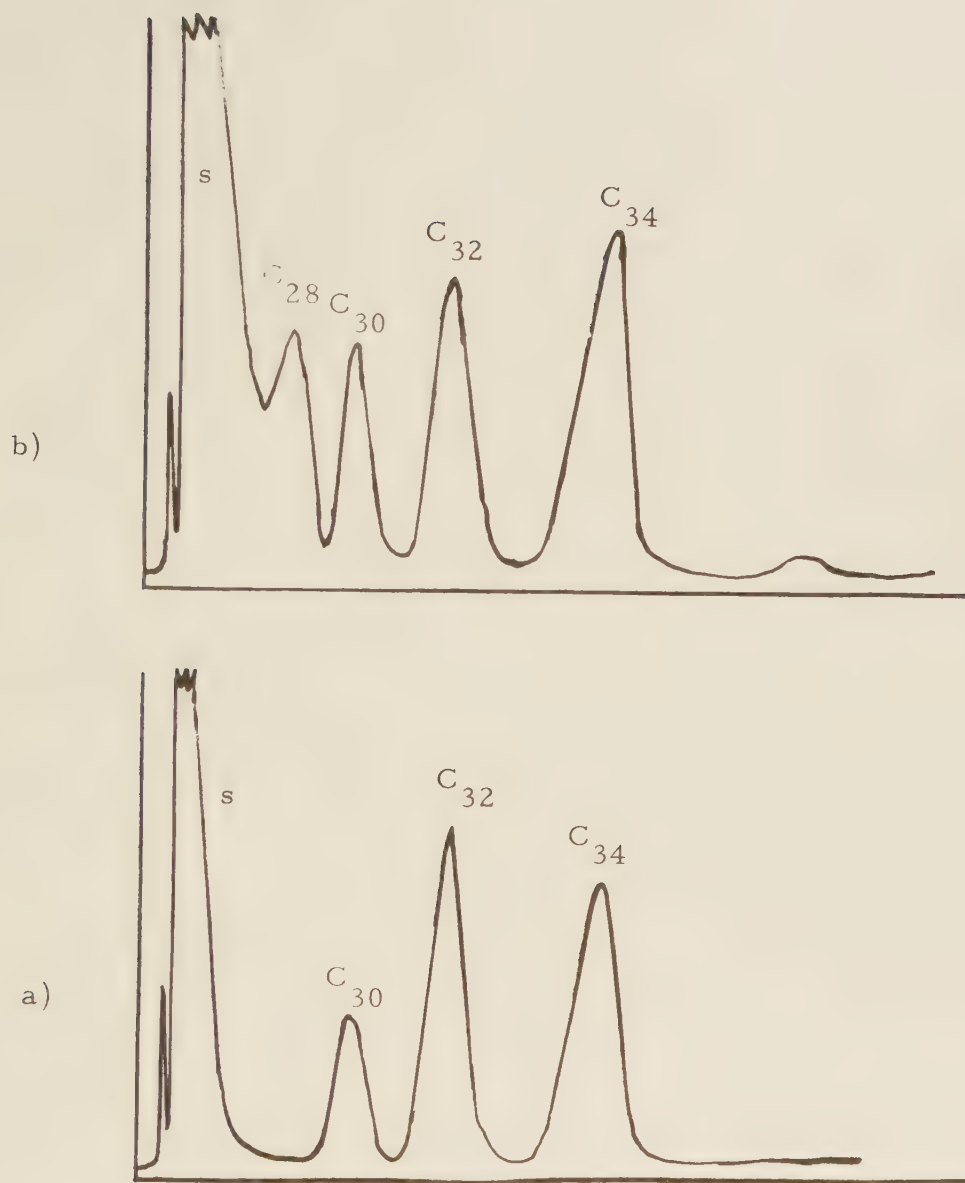


Fig. 9. a) Chromatogramme des hydroxyacides de *Gascardia madagascariensis* réduits par IH + P et méthylés sur Silicone rubber 20 % à 280°.

b) Chromatogramme des esters méthyliques des acides témoins C_{28} , C_{30} , C_{32} et C_{34} dans les mêmes conditions.

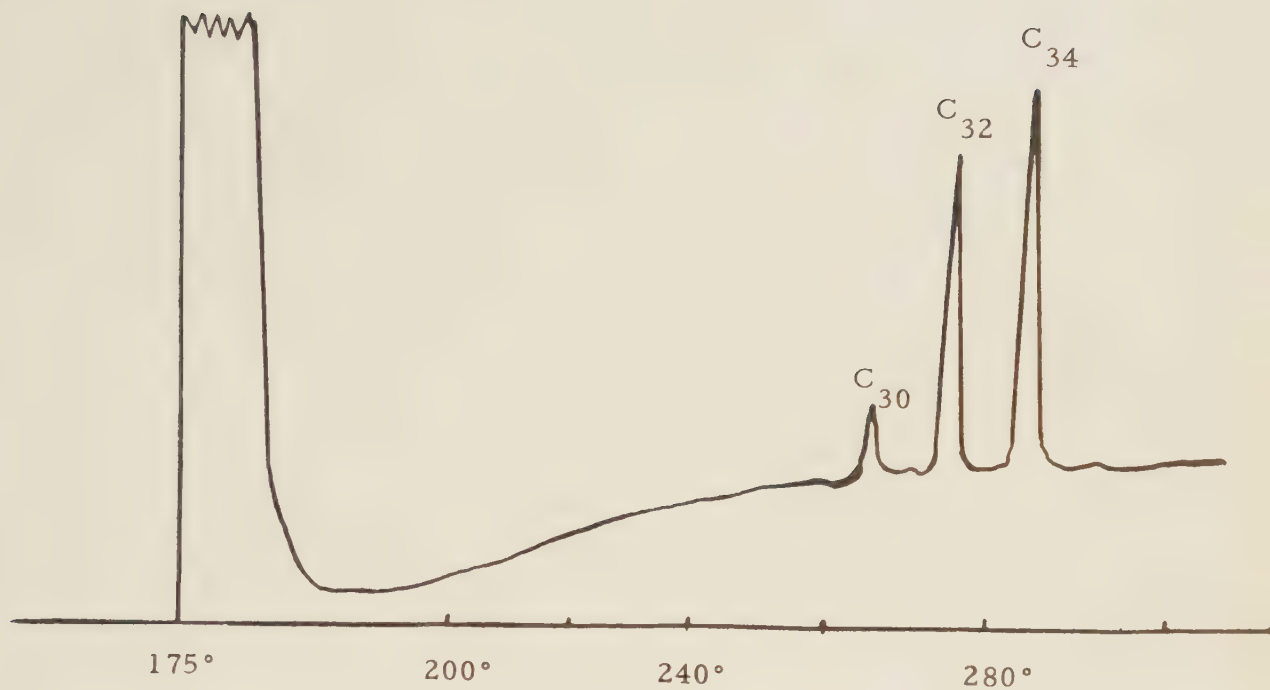


Fig.12. Chromatogramme des alcanes obtenus après réduction des hydroxyacides de Gascardia madagascariensis sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 175° à 300°.

L'ester méthylique de l'hydroxyacide est saponifié par la potasse méthanolique, on obtient un produit blanc, saturé au tétranitrométhane, F. 103°, P.M. (acidimétrie) = 775, calculé pour $C_{33}H_{66}O_3$: 511. La faible acidité trouvée laisse supposer qu'une partie du produit s'est lactonisée, c'est en effet ce qu'indique le spectre infra-rouge présentant à la fois les bandes des acides gras (1680 et 1300 cm^{-1}) et des lactones (1720 et 1160 cm^{-1}) (fig. 13). D'autre part l'action de l'hydroxylamine et du chlorure ferrique sur la fraction II saponifiée est positive ce qui confirme la présence d'une fonction lactone.

La possibilité que présente l'hydroxyacide de se lactoniser partiellement élimine la position α pour l'hydroxyle ce que confirme l'oxydation permanganique: l'hydroxyacide en solution dans l'acétone est oxydé par le permanganate puis estérifié par le diazométhane et chromatographié. On obtient un produit, F. 86°, présentant les mêmes caractéristiques que le céto-ester déjà décrit. Les α hydroxyacides donnant par oxydation par le tétracétate de plomb ou le permanganate de potassium un acide normal avec un atome carbone de moins (179) la fraction II des acides de Gascardia madagascariensis ne possède donc pas d' α hydroxyacides.

Les positions α , β , ou ω pour l'hydroxyle étant éliminées, celui-ci est situé dans le milieu de la chaîne carbonée. Afin de connaître la position exacte de la fonction alcool nous avons réalisé une oxydation totale du mélange d'hydroxyacides par l'anhydride chromique dans l'acide acétique qui coupe la chaîne carbonée au niveau de la liaison -OH. Les acides ainsi obtenus sont méthylés par le diazométhane et les esters sont chromatographiés sur alumine. Par chromatographie gaz-liquide nous avons identifié une série homologue des esters méthyliques des monoacides saturés de C_{10} à C_{20} et des diacides saturés de C_{14} à C_{24} .

La fraction II des acides de Gascardia madagascariensis n'est pas seulement un mélange de 3 hydroxyacides : pour une

même longueur de la chaîne carbonée nous avons plusieurs positions de la fonction alcool vers le milieu de la chaîne.

Cette fraction est un mélange complexe de plusieurs mono hydroxyacides saturés en C_{30} , C_{32} et C_{34} , de formule générale :



"n" variant de 9 à 18 et "m" de 13 à 22 de sorte que "n" + "m" = 27, 29 ou 31.

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES

La fraction II de la chromatographie N°5 (p.67) éluée par le solvant benzène méthanol 9:1 est recristallisée 2 fois dans l'acétate d'éthyle. Elle est insoluble dans la plupart des solvants à température ordinaire mais soluble dans le benzène et le chloroforme à 45°, et légèrement soluble dans l'acétone et l'acétate d'éthyle à l'ébullition. Elle présente les caractéristiques suivantes :

F. 91°

$[\alpha]_D = -2^\circ \pm 0,5^\circ$ (dans le chloroforme)

Analyse.

Trouvé % C	77,86	Calculé % pour $C_{34}H_{68}O_3$	C	77,80
H	13,04		H	13,06
(O)-CH ₃	5,94		(O)-CH ₃	5,90
(C)-CH ₃	2,70		(C)-CH ₃	2,86

1. Formation d'un monoacétate

1°/ Anhydride acétique-pyridine

1,530 g d'hydroxyester dissous dans 6 ml du mélange anhydride acétique-pyridine 1:3 sont mis sous reflux pendant 50 minutes. Après refroidissement on ajoute 10 ml d'eau et on évapore les solvants sous vide. Le résidu est repris par le chloroforme et l'eau, après plusieurs lavages à l'eau distillée la phase chloroformique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée. Le produit obtenu (1,510 g) est chromatographié sur une colonne de trisilicate de magnésium-célite à 56°.

Chromato. N°7

Fraction II acétylée	1,510 g
(Trisilicate de magnésium)	40 g
(Célite)	20 g
Elution par fractions de	100 ml
1. Ether de pétrole - benzène 4:1	4 mg
2. "	545
3. "	418
4. "	43
5. "	29
6. "	26
7. "	7
8. Ether de pétrole - benzène 1:1	4
9. "	24
10. Benzène	17
11. "	29
12. "	9
13. "	7
14. Benzène - Ether 4:1	41
15. "	67
16. "	22
17. "	7
18. Ether	15
19. Benzène - Méthanol 1:1	0
20. "	88
21. "	0
Total	1,402 g

Les éluats 2 et 3 réunis sont recristallisés dans l'acétate d'éthyle : on obtient un solide blanc, F. 80°5.

Analyse.

Trouvé % C	75,81	Calculé %	$C_{36}H_{70}O_4$	C	76,26
H	12,42			H	12,45

2°/ Anhydride acétique-Acétate de sodium

2,600 g d'hydroxyester dans 35 ml d'anhydride acétique sont mis sous reflux pendant 18 heures avec 3,200 g d'acétate de sodium anhydre fondu et resolidifié. L'anhydride en excès est alors hydrolysé à chaud et le produit de la réaction est repris par le chloroforme et l'eau. La phase chloroformique lavée à l'eau jusqu'à neutralité, est séchée sur sulfate de sodium et distillée; on a 2,740 g d'un produit qu'on chromatographie sur alumine à 56°.

Chromato. N°8

Fraction II acétylée		2,740 g
Alumine II		55 g
Elution par fractions de		200 ml
1.	Hexane	968 mg
2.	"	196
3.	"	77
4.	"	38
5.	Hexane - Benzène 1:1	149
6.	"	28
7.	"	28
8.	Benzène	62
9.	"	38
10.	Benzène - Méthanol 9:1	730
11.	"	17
Total		2,331 g

Les éluats 1 à 5 présentent le spectre infra-rouge d'un ester méthylique saturé et acétylé; c'est un solide blanc, F. 80°5.

2. Oxydation ménagée de la fonction alcool : formation d'une cétone.

Les méthodes employées habituellement pour l'oxydation ménagée des alcools se sont révélées inefficaces sur l'hydroxy-ester en raison de son insolubilité à froid. En opérant dans le benzène à 45° la dissolution est totale mais il y a coupure de la molécule. La meilleure technique consiste à mettre l'ester en suspension dans l'acétone avant de faire agir l'anhydride chromique : ce solvant a déjà été employé par Matic (180) puis Meakins et Swindells (181) pour l'oxydation ménagée des hydroxyacides.

A 310 mg de la fraction II en suspension dans 75 ml d'acétone à 40°, on ajoute peu à peu une solution sulfurique d'anhydride chromique ($\text{CrO}_3 = 300$ mg, eau = 10 ml, H_2SO_4 concentré = 1,5 ml), le réactif étant préalablement chauffé à 40°. Le mélange est agité pendant 30 minutes à cette température. On ajoute ensuite 100 ml d'eau chaude puis on extrait par le benzène à chaud. La solution benzénique lavée à l'eau jusqu'à neutralité, est séchée sur sulfate de sodium et le solvant est évaporé. On obtient ainsi 305 mg de produit que l'on chromatographie sur alumine à 45°.

Chromato. N°9

	Fraction II oxydée	305 mg
	Alumine II	6 g
	Elution par fractions de	25 ml
1.	Benzène	161 mg
2.	"	20
3.	"	3
4.	Benzène - méthanol 9:1	44
5.	"	6
Total		234 mg

L'éluat n°1 recristallisé 2 fois dans l'acétate d'éthyle est une poudre blanche, F. 86°; le spectre infra-rouge montre la

disparition de la fonction hydroxyle et l'apparition d'une fonction cétone.

Analyse.

Trouvé %	C 77,76	Calculé %	$C_{34}H_{66}O_3$	C	78,10
	H 12,75			H	12,72

Saponification du cétoester

98 mg sont dissous dans 2 ml de benzène et saponifiés par 2 ml de potasse méthanolique à 5 %. Après acidification par HCl 6 N on reprend par le benzène et l'eau; le benzène est lavé jusqu'à neutralité puis évaporé: on obtient ainsi 79 mg d'une poudre blanche, F. $102^{\circ}5$.

P.M. (par acidité) 498. Calculé pour $C_{33}H_{64}O_3$ 509

3. Réduction par le phosphore : formation de l'acide normal

413 mg de l'hydroxyester en solution dans 10 ml de benzène sont saponifiés par 10 ml de potasse méthanolique à 5 %. Après extraction par le benzène on obtient 400 mg d'acide. L'acide est dissous dans 12 ml d'acide iodhydrique à 57 % ($d = 1,7$), on ajoute 120 mg de phosphore rouge et on laisse sous reflux pendant 18 heures. Après refroidissement on décante l'acide iodhydrique tandis que l'acide qui s'est solidifié à la surface du liquide est dissous dans le benzène. Le benzène est repris par une solution d'hyposulfite à 5 %, lavé à l'eau chaude, séché sur sulfate de sodium, puis évaporé.

L'ester iodhydrique obtenu (233 mg) dissous dans 55 ml du mélange éthanol-méthanol-eau (40:10:5) est traité pendant 4 heures sous reflux par 230 mg de poudre de zinc et 4 ml d'acide chlorhydrique concentré. Les solvants sont évaporés, le résidu est saponifié puis méthylé par le diazométhane en solution dans

l'éther. L'ester est ensuite chromatographié sur une colonne d'alumine à 40°.

Chromato. N°10

Fraction II réduite par IH + P		
Alumine activité II		4 g
Elution par fractions de		25 ml
1.	Hexane - Benzène 1:1	179 mg
2.	"	8
3.	"	5,5
4.	Benzène - Méthanol 9:1	9
5.	"	7
Total.		208,5 mg

L'éluat n°1, reprécipité dans l'acétate d'éthyle, est un solide blanc, F. 73°5, saturé au tétranitrométhane, qui possède le spectre infra-rouge d'un ester méthylique non hydroxylé.

Analyse.

Trouvé %	C	79,80	Calculé %	$C_{34}H_{68}O_2$	C	80,24
	H	13,10			H	13,47

Chromatographie gaz-liquide de l'ester méthylique

Quelques milligrammes de la chromato. 10, fraction 1, dissous à 50° dans le dioxanne sont chromatographiés sur la colonne de Silicone rubber 20 % à 280°.

Saponification de l'ester méthylique

Une partie de l'éluat n°1 de la chromatographie n°10 est saponifiée par la potasse méthanolique à 5 % et après extraction par le benzène chaud on obtient un produit qui, après plusieurs recristallisations dans le benzène et l'alcool absolu, présente les caractéristiques suivantes : F. 91°5, spectre infra-rouge d'un acide gras normal.

Analyse.

Trouvé % C 79,80
H 13,16

Calculé % $C_{33}H_{66}O_2$ C 80,09
H 13,44

4. Réduction par $LiAlH_4$ et formation d'un hydrocarbure

1°/ Formation d'un diol

1,500 g de la fraction II dissous à 40° dans 120 ml de tétrahydrofurane préalablement séché sur sodium sont peu à peu mélangés avec 1,550 g de $LiAlH_4$ en suspension dans 30 ml du même solvant à 40°. L'ensemble est maintenu pendant 30 minutes à 40° et agité de temps en temps. On détruit alors l'excès de $LiAlH_4$ par 15 ml d'eau et on acidifie par 45 ml d'acide sulfurique 3 N. Le tétrahydrofurane est évaporé et le produit de la réduction dissous à chaud dans le chloroforme.

La phase chloroformique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée: le résidu dissous dans 25 ml de benzène est saponifié par la potasse méthanolique à 5 %. Le produit de la saponification en solution dans le benzène est passé sur une colonne de carbonate de sodium (100-250 mesh) maintenue à 56° afin de séparer le diol obtenu de l'hydroxyacide n'ayant pas réagi.

La fraction non retenue par le carbonate (1,285 g) est recristallisée dans l'acétate d'éthyle; on obtient un diol, F. 112°.

Analyse.

Trouvé % C 79,24
H 13,47

Calculé % $C_{33}H_{68}O_2$ C 79,77
H 13,80

2°/ Acétylation du diol

212 mg de diol sont dissous dans 1,4 ml du mélange anhydride acétique-pyridine 1:3 et chauffés sous reflux pendant 45 minutes. On ajoute 2 ml d'eau et les solvants sont évaporés

sous vide. Le résidu est repris par le chloroforme et l'eau, et la phase chloroformique, séchée sur sulfate de sodium, est évaporée: on obtient 240 mg d'un produit que l'on chromatographie sur alumine à 40°.

Chromato. N°11

	Diol acétylé	240 mg
	Alumine activité II	4 g
	Elution par fractions de	20 ml
1.	Hexane - Benzène 4:1	132 g
2.	"	39
3.	"	11
4.	Benzène	34
5.	"	5
6.	Benzène - Méthanol 9:1	17
7.	"	0
Total		238 mg

Les éluats 1 et 2 réunis sont recristallisés deux fois dans l'acétate d'éthyle; on a une poudre blanche, F. 76°5, dont l'analyse est en accord avec celle d'un diacétate de diolén C_{33} .

Analyse.

Trouvé %	C	76,15	Calculé %	$C_{37}H_{72}O_4$	C	76,49
	H	12,46			H	12,49
	(CO)-CH ₃	5,19			(CO)-CH ₃	5,16

3°/ Formation du diester iodhydrique du diol

1,0 g de diol est dissous dans 50 ml d'acide iodhydrique à 57 % ($d = 1,7$) et chauffé sous reflux avec 2 g de phosphore rouge pendant 26 heures. Après refroidissement l'acide iodhydrique est décanté, le produit mis en solution dans le benzène est lavé successivement par l'hyposulfite de sodium à 5 % et l'eau. On récupère alors 1,210 g d'une poudre légèrement jaunâtre F. 79°. Son spectre infra-rouge est celui d'un ester iodhydrique (fig.14)

Analyse.

Trouvé %	C	55,89	Calculé %	$C_{33}H_{66}I_2$	C	55,30
	H	9,26			H	9,22
	I	35,07			I	35,31

4°/ Réduction du diester iodhydrique en hydrocarbure

A 1,150 g d'ester iodhydrique dissous dans 80 ml de tétrahydrofurane on ajoute une suspension de 1,700 g de $LiAlH_4$ dans 40 ml du même solvant, et on laisse 40 minutes à 40°. L'excès de $LiAlH_4$ est hydrolysé, après acidification le tétrahydrofurane est évaporé et le mélange repris par le benzène. La phase benzénique lavée à l'hyposulfite de sodium à 5 % et à l'eau est séchée sur sulfate de sodium et distillée.

Le produit de la réduction dissous dans 20 ml de benzène est saponifié par 20 ml de potasse méthanolique 0,5 N et chromatographié sur alumine à 50°.

Chromato. N°12

diester iodhydrique réduit et saponifié
 Alumine activité I.
 Elution par fractions de

18 g
 50 ml

1.	Hexane	778 mg
2.	"	9
3.	"	7
4.	"	9
5.	Hexane - Benzène 1:1	9
6.	-	4
7.	Benzène	4
8.	"	6
9.	Benzène - Méthanol 9:1	73
10.	"	0
Total		899 mg

L'éluat n°1 recristallisé dans l'alcool absolu est un solide blanc, F. 70°, le spectre infra-rouge est celui d'un hydrocarbure (fig. 11): un très léger pic à 1260 cm^{-1} indique encore quelques

impuretés d'ester iodhydrique ce qui expliquerait la proportion relativement faible de carbone et d'hydrogène à l'analyse

Analyse.

Trouvé %	C	84,48	Calculé %	$C_{33}H_{68}$	C	85,26
	H	14,33			H	14,74

5°/ Chromatographie gaz-liquide de l'hydrocarbure

Le mélange d'hydrocarbure dissous à 50° dans le dioxanne est chromatographié sur colonne de Silicone rubber avec programmation de 175° à 300°. Les témoins chromatographiés dans les mêmes conditions sont des hydrocarbures en C_{28} et C_{32} .

5. Saponification

200 mg de la fraction II dissous dans 5 ml de benzène sont laissés pendant 2 heures sous reflux avec 5 ml de potasse méthanolique à 5 %. Les solvants sont évaporés, et après acidification par HCl 6 N au bain-marie bouillant les acides sont extraits par le chloroforme. Une recristallisation dans le benzène donne un solide blanc, F. 102°-103°.

Réaction de la fonction lactone (182)

10 mg de la fraction précédente sont dissous dans le benzène à chaud. On ajoute 2 gouttes de solution alcoolique saturée de chlorhydrate d'hydroxylamine et 2 gouttes de potasse éthanolique saturée. On laisse quelques instants au bain-marie bouillant et après refroidissement le mélange est acidifié par HCl 2 N. L'addition d'une goutte de chlorure ferrique à 1 % donne une coloration rose violacée, réaction caractéristique des acides hydroxamiques.

6. Oxydation permanganique: formation d'une cétone

505 mg d'hydroxyester dissous dans le benzène sont saponifiés par la potasse méthanolique à 5 % et le produit de la saponification en solution dans 300 ml d'acétone est traité sous reflux par 600 mg de permanganate de potassium pulvérisé ajouté par petites quantités. Au bout de 9 heures la coloration rose a disparu, l'acétone est évaporé et le sel de potassium de l'acide est séparé du bioxyde de manganèse par 3 extractions avec 100 ml d'alcool absolu bouillant. La solution alcoolique filtrée à chaud est acidifiée par HCl 6 N et concentrée à 30 ml: on obtient un précipité blanc qui est centrifugé, lavé par l'alcool à 96° jusqu'à neutralité et séché sous vide. Cet acide (150 mg) dissous dans le benzène est méthylé par le diazométhane dans l'éther, puis chromatographié sur alumine à 45°.

Chromato. N°13

	Hydroxyacide oxydé et méthylé	150 mg
	Alumine activité II	5 g
	Elution par fractions de	25 ml
1.	Hexane - Benzène 1:1	39 mg
2.	"	42
3.	"	56
4.	"	2
5.	Benzène	0
6.	Benzène - Méthanol 9:1	9
7.	"	1
8.	"	0
Total		149 mg

Les éluats 1 à 3 réunis et recristallisés dans l'acétate d'éthyle, se présentent comme une poudre blanche, F. 86°, dont le spectre infra-rouge est celui d'un cétoester.

7. Oxydation avec coupure de la chaîne carbonée

493 mg de la fraction II saponifiée sont dissous dans

35 ml d'acide acétique distillé sur anhydride chromique et mis au bain-marie à 78° avec 295 mg d'anhydride chromique. Au bout de 5 heures la solution prend une teinte verte, on rajoute alors en trois fois 820 mg d'anhydride chromique. L'oxydation est arrêtée après 36 heures par l'addition de quelques gouttes de méthanol et le mélange repris à chaud par l'eau et le benzène. La phase benzénique est lavée à l'eau jusqu'à neutralité et séchée sur sulfate de sodium.

Les acides obtenus, en solution dans 20 ml de benzène, sont méthylés pendant une nuit à 35° par le diazométhane en solution dans l'éther. Les solvants sont évaporés et les esters méthyliques chromatographiés sur alumine à 56°.

Chromato. N°14

Produit d'oxydation de l'hydroxyacide méthylé.

Alumine activité II 8 g

Elution par fractions de 50 ml

1.	Hexane	105 mg
2.	"	25
3.	"	4
4.	Hexane - Benzène 1:1	18

Total 152 mg

Identification des monoacides et des diacides

Les deux premiers éluats de la chromatographie n°14 doivent contenir les monoesters et les diesters résultant de la coupure au niveau de la fonction alcool en mélange avec des cétoesters non oxydés; nous avons effectué un fractionnement par précipitation dans l'alcool.

L'éluat n°1 est dissous à chaud dans l'alcool à 96°. A froid une partie reprécipite; les 2 fractions sont chromatographiées en phase gazeuse sur colonne de Silicone rubber.

- La fraction soluble à froid dans l'alcool est un solide blanc dans lequel on identifie les monoesters de C₁₀ à C₂₀.

- La fraction insoluble dans l'alcool est un mélange des cétoesters en C_{30} - C_{32} et C_{34} .

- Les diesters sont trouvés dans l'éluat n°2: on identifie les homologues de C_{14} à C_{25} .

8. Préparation de quelques autres dérivés

1°/ Formation de l'oxime

1,030 g de cétoester sont dissous dans 200 ml de benzène chaud. On ajoute 100 ml d'alcool à 80° contenant en solution 450 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine et 500 mg d'acétate de sodium, et on laisse sous reflux pendant 4 heures. Les solvants sont évaporés et le résidu est repris à chaud par le benzène et l'eau. Le benzène, lavé plusieurs fois à l'eau, séché sur sulfate de sodium et évaporé, laisse 935 mg de produit.

Après recristallisations dans l'acétate d'éthyle on a un solide blanc, F. 89°5, dont le spectre infra-rouge (fig. 15) est celui d'une oxime avec la bande N-OH à 3400 cm^{-1} et la bande $C = N$ à 1600 cm^{-1} .

Analyse.

Trouvé %	C	75,66	Calculé %	$C_{34}H_{67}O_3N$	C	75,93
	H	12,57			H	12,54
	N	2,21			N	2,60

2°/ Formation de l'amide

Il est obtenu par transposition de Beckmann à partir de l'oxime. 410 mg d'oxime sont dissous dans 15 ml d'acide sulfurique concentré et mis au bain-marie bouillant pendant 2h30.

Après refroidissement on ajuste à pH = 4-5 par de l'ammoniaque concentré et on reprend par l'eau et le chloroforme.

Le chloroforme dissout 166 mg d'un produit qui après

trois recristallisations dans l'acétone a l'aspect d'une poudre jaunâtre, F. 98°-100°. Le spectre infra-rouge (fig.16) est celui d'un amide.

3°/ Déshydratation de l'hydroxyester

La déshydratation au niveau de la fonction alcool a été faite par pyrolyse de l'acétate.

463 mg de la fraction II acétylée sont mis dans un tube à boules sous la pression atmosphérique. A 260° il pyrolyse 194 mg d'un liquide incolore, insaturé au tétranitrométhane, et dont le spectre infra-rouge montre la disparition de la bande caractéristique de l'acétate et l'apparition à 1610 cm^{-1} de la liaison éthylénique $-\text{CH} = \text{CH}-$.

VI. COMPOSITION DE LA CIRE

A. RESULTATS OBTENUS

La plus grande partie de ce chapitre vient d'être consacrée à l'identification des constituants de la cire de Gascardia madagascariensis préalablement séparés en groupes homologues. Nous constatons qu'elle contient exclusivement des substances saturées et sa composition brute est la suivante :

hydrocarbures	C ₂₅ à C ₃₁	pairs et impairs	0,6 %
alcools primaires	C ₂₆ à C ₃₂	pairs	28,0 %
acides non hydroxylés	C ₂₆ à C ₃₆	traces des inf ^r	38,0 %
acides hydroxylés	C ₃₀ à C ₃₄	pairs	33,4 %

Pour que cette étude soit complète il importe de préciser la forme sous laquelle se trouvent les différents composés dans la cire: alcools et acides libres ou esters.

1. Etude des acides libres

Le passage de la cire sur une colonne de carbonate de sodium selon la technique classique permet d'isoler les acides libres. Ces acides sont méthylés et les esters méthyliques sont fractionnés par chromatographie sur alumine.

1°/ Acides non hydroxylés

Une première fraction éluée par l'hexane-benzène qui correspond aux acides non hydroxylés est chromatographiée en phase gazeuse sur Silicone rubber avec programmation de 165° à 320° (fig.17a) : nous retrouvons les acides pairs de C₂₈ à C₃₆

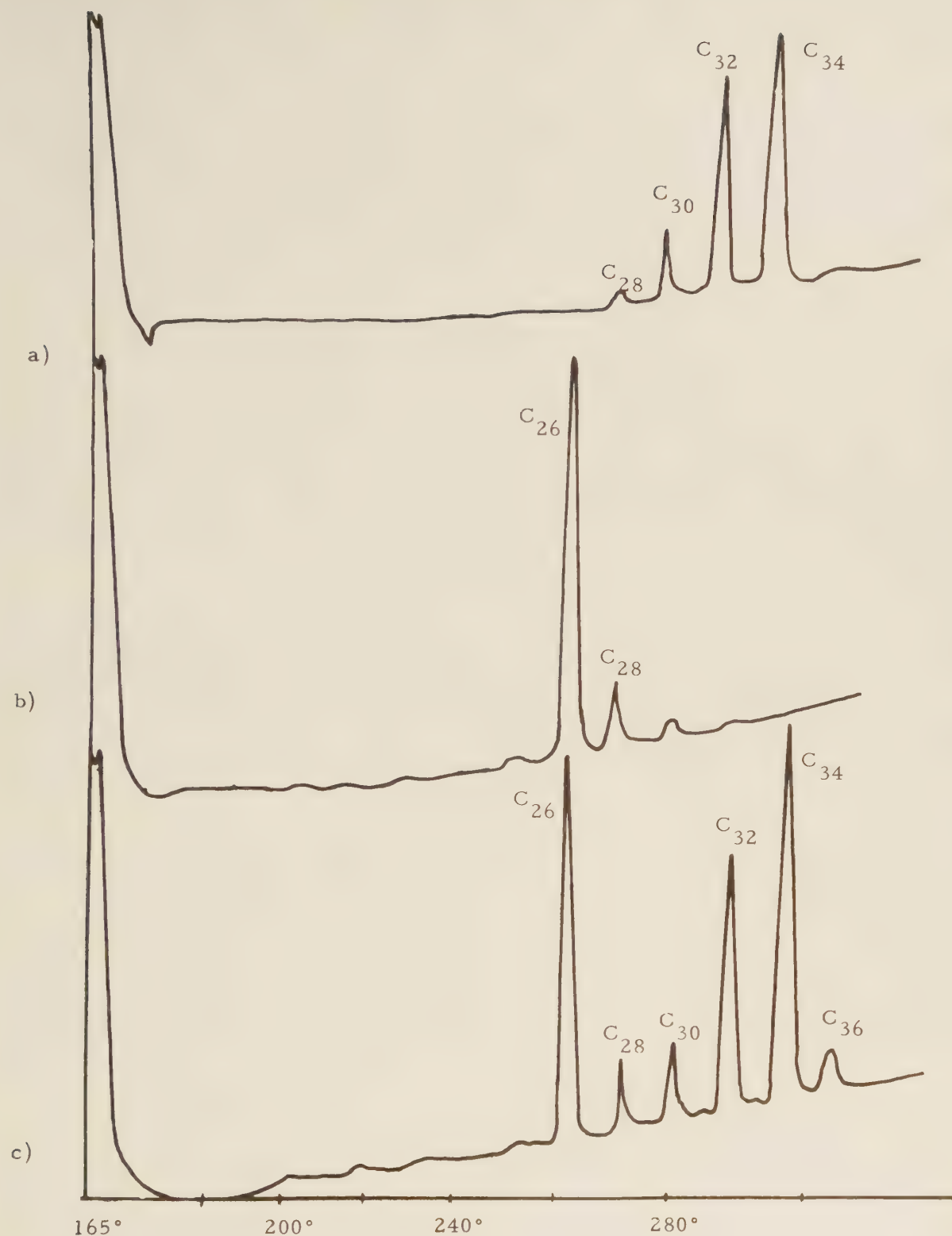


Fig.17. a) Chromatogramme des esters méthyliques des acides libres non hydroxylés de Gascardia madagascariensis; sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 165° à 320°.
 b) Chromatogramme des esters méthyliques des acides liés de Gascardia madagascariensis dans les mêmes conditions.
 c) Chromatogramme des esters méthyliques des acides non hydroxylés de Gascardia madagascariensis dans les mêmes conditions pour référence.

dans la même proportion que dans la fraction I des acides totaux, les acides dotriacontanoïque et tétratriacontanoïque étant toujours nettement les plus abondants; les acides impairs en C_{31} et C_{33} existent seulement à l'état de traces.

2° Acides hydroxylés

La seconde fraction éluée par le mélange benzène- méthanol 9:1 doit contenir les hydroxyesters. On la purifie par une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions: on obtient ainsi une poudre blanche, F. 91° , ayant le spectre infra-rouge d'un ester méthylique hydroxylé.

L'identification avec la fraction II des acides totaux est faite par la comparaison de leurs acétates: l'acétylation de la fonction alcool est réalisée par le mélange anhydride acétique pyridine; on obtient un solide blanc, F. $80^{\circ}5$, présentant les mêmes caractéristiques que le mélange des monohydroxyesters C_{30} , C_{32} et C_{34} acétylés.

2. Etude de la fraction neutre

La fraction non retenue par le carbonate de sodium après l'isolement des acides libres est chromatographiée directement sur alumine à 56° : on sépare différentes fractions, chacune d'entre elles a été étudiée.

<u>N° fraction</u>	<u>Eluant</u>
I	tétrachlorure de carbone
II	benzène
III	benzène-méthanol 99:1
IV	benzène-méthanol 9:1

1°/ Fraction I

C'est un solide blanc dont le spectre infra-rouge

présente une forte bande ester à 1741 cm^{-1} . La saponification donne une fraction acide et une fraction alcool étudiées chacune par chromatographie en phase gazeuse sur Silicone rubber.

La fraction acide contient l'acide hexacosanoïque sensiblement pur avec un peu d'acide octacosanoïque, les autres acides pairs de C_{24} à C_{34} étant seulement à l'état de traces (fig. 17b). On identifie l'hexacosanol seul dans la fraction alcool (fig. 18).

La fraction I est donc de l'hexacosanoate d'hexacosanol ou cérotate de céryle, avec un peu d'octacosanoate d'hexacosanol.

2°/ Fraction II

Après plusieurs reprécipitations dans l'acétate d'éthyle, c'est une poudre blanche qui présente le spectre infra-rouge d'un alcool primaire à longue chaîne. Par chromatographie en phase gazeuse de cette fraction sur Silicone rubber on retrouve sensiblement dans les mêmes proportions tous les alcools isolés précédemment (chap.IV, parag.III) (fig. 19). L'hexacosanol qui constitue 72 % des alcools totaux existe donc à la fois sous forme libre et estérifiée.

3°/ Fraction III

Solide jaune, légèrement pâteux, son spectre infra-rouge comporte les bandes caractéristiques des alcools et une bande ester: un nouveau fractionnement par chromatographie sur alumine à 56° donne les alcools déjà identifiés dans la fraction précédente et une fraction plus adsorbée sur la colonne constituée par des résines.

4°/ Fraction IV

Cette fraction jaune a l'aspect d'une résine. Par

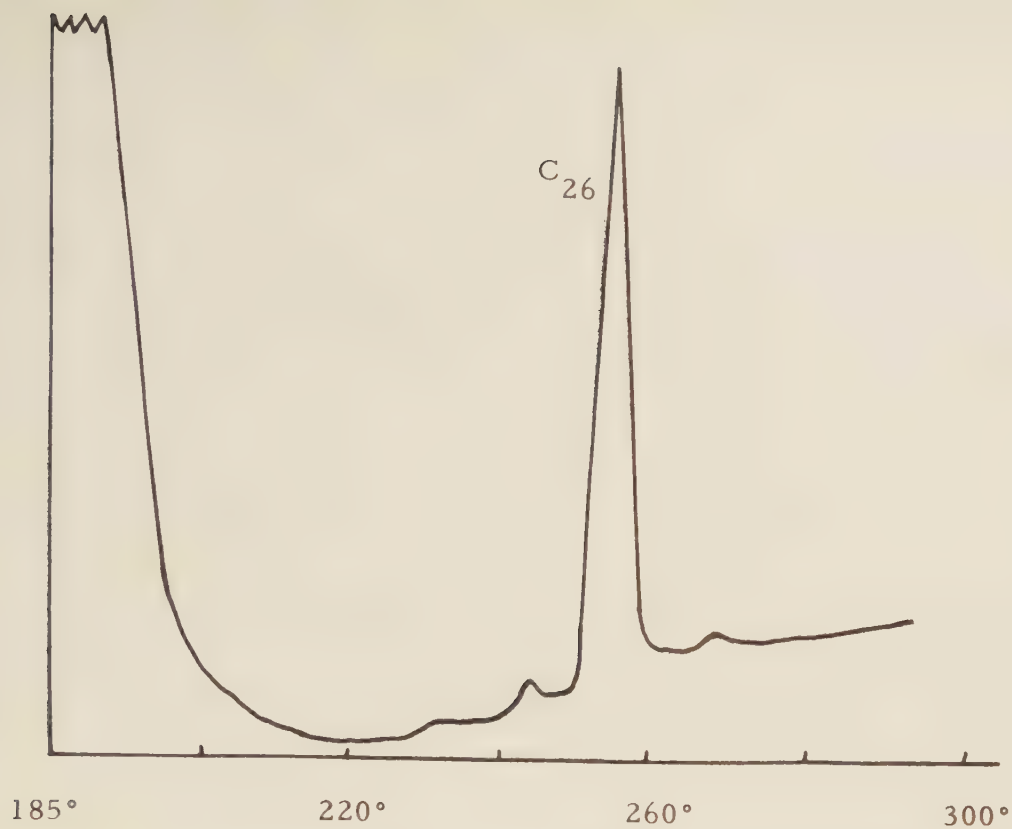


Fig.18. Chromatogramme des alcools liés de Gascardia madagascariensis sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 185° à 300°.

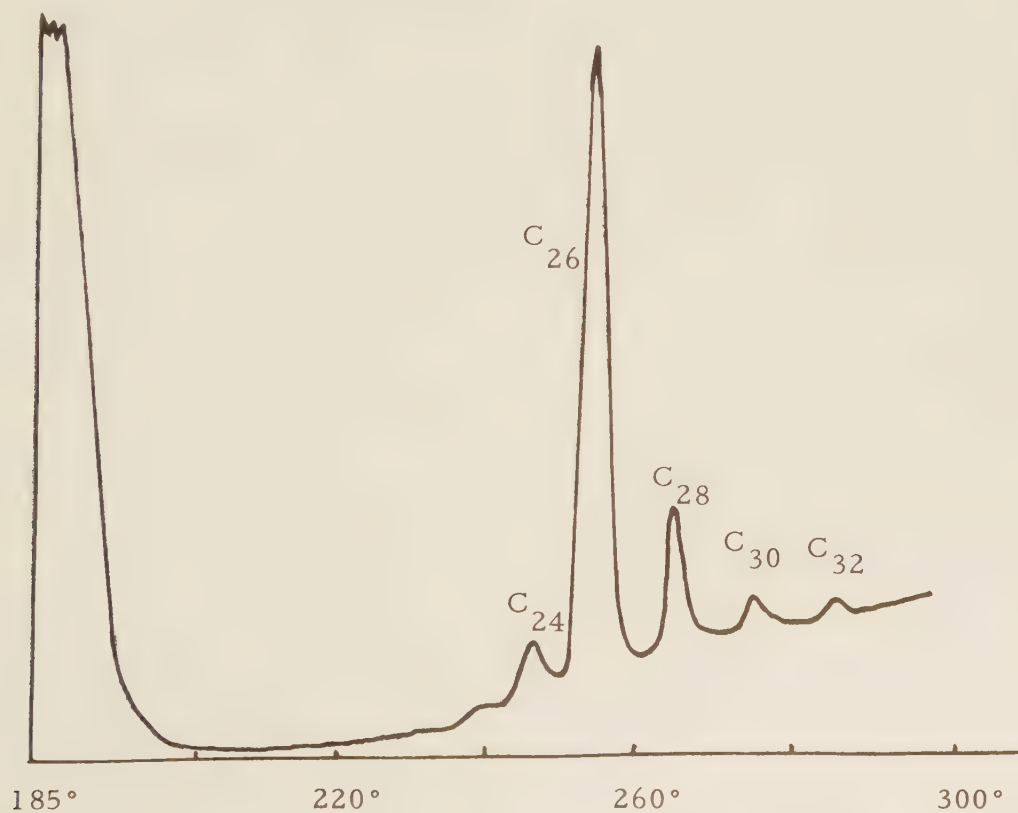


Fig.19. Chromatogramme des alcools libres de Gascardia madagascariensis sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 185° à 300°.

saponification elle donne un mélange d'acides et d'alcools : le spectre infra-rouge complexe de ces composés indique qu'il s'agit d'un mélange de substances non cireuses que nous n'avons pas étudiées davantage.

3. Composition de la cire

La cire de Gascardia madagascariensis contient des hydrocarbures puis des alcools et des acides existant à la fois sous forme libre et sous forme d'esters. Sa composition est schématisée dans le Tableau X

TABLEAU X

Composition de la cire de Gascardia madagascariensis

Hydrocarbures	C_{25} à C_{31}	0,6 %
Acides gras libres	$\left\{ \begin{array}{l} \text{traces de } C_{16} \text{ à } C_{24} \\ C_{28} \text{ à } C_{34} \end{array} \right\}$	28,0 %
Hydroxyacides libres	$C_{30} - C_{32} - C_{34}$	33,4 %
Alcools libres	C_{24} à C_{32}	18,0 %
Esters	cérotate de céryle	20,0 %

Nous remarquons que dans la cire de Gascardia tous les hydroxyacides, qui constituent 33,4 % de la cire, sont sous forme libre ainsi que les acides non hydroxylés de C_{28} à C_{36} . L'acide hexacosanoïque est entièrement estérifié par l'hexacosanol, le cérotate de céryle représentant 20 % de la cire totale.

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES

1. Etude des acides libres

La cire (18,5 g) est dissoute dans le benzène et passée sur une colonne de carbonate de sodium (100-250 mesh) maintenue à 56°. Après dissolution dans l'eau et acidification de la colonne par l'acide chlorhydrique concentré en recueille 2,5 g d'acides.

Ces acides en solution dans 100 ml de benzène à 40° sont méthylés par le diazométhane dans l'éther et chromatographiés sur alumine à 56°.

Chromato. N°15

	Esters méthyliques	2,5 g
	Alumine II	100 g
	Elution par fractions de	100 ml
1.	Hexane - Benzène 1:1	0 mg
2.	"	616
3.	Benzène	110
4.	"	26
5.	"	4
6.	"	2
7.	Benzène - Méthanol 9:1	6
8.	"	1164
9.	"	37
10.	"	23
11.	"	6
Total		1994 g

1°/ Acides non hydroxylés

Les éluats 2 et 3 réunis sont recristallisés dans l'acétate d'éthyle: on a un solide blanc, F.75°; le spectre infrarouge est celui d'un ester méthylique saturé à chaîne droite.

La chromatographie gaz-liquide est faite sur une

colonne de Silicone rubber, les esters étant injectés en solution dans le dioxanne à 50°.

2°/ Acides hydroxylés

Les éluats 8 à 11 de la chromatographie n°15 sont réunis et rechromatographiés sur alumine à 56°.

Chromato. N°16

Chromato.N°15, fr.8 à 11 :	1,230 g
Alumine II	25 g
Elution par fractions de	50 mg
1. Benzène	47 mg
2. "	98
3. "	53
4. "	21
5. "	13
6. Benzène-méthanol 9:1	472
7. "	47
8. "	7
9. Chloroforme-acide acétique 2 %	50
10. "	106
11. "	74
12. "	11
Total	999 mg

L'alumine à 56° hydrolyse fortement les esters méthyliques ce qui explique le faible rendement de la chromatographie n°15 et l'importante fraction acide éluee par le mélange chloroforme-acide acétique dans la chromato.n°16.

L'éluat n°6, recristallisé 2 fois dans l'acétate d'éthyle, est une poudre blanche, F. 91°.

Acétylation. 202 mg de l'éluat n°6 dissous dans 1,6ml du mélange anhydride acétique-pyridine 1:3 sont mis 50 minutes au bain-marie bouillant. On ajoute 3 ml d'eau chaude et les solvants sont distillés sous vide. Le résidu dissous dans le benzène est lavé plusieurs fois à l'eau distillée, la phase benzénique

est alors séchée sur sulfate de sodium, évaporée et l'acétate récupéré est chromatographié sur alumine à 56°

Chromato. N°17

Chr. N°16, fr. 6 acétylée		
Alumine II		4 g
Elution par fractions de		25 ml
1.	Hexane - benzène 1-4	6 mg
2.	"	64
3.	"	17
4.	Benzène	8
5.	Benzène - méthanol 9-1	43
6.	"	14
Total		152 mg

L'éluat n°2 est recristallisé 2 fois dans l'acétone F. 80°5.
Son spectre infra-rouge possède une forte absorption à 1240 et 1030 cm^{-1} , caractéristique du groupement acétyle.

2. Etude de la fraction neutre

Après passage de la cire totale sur le carbonate de sodium la fraction neutre est en solution dans le benzène; le solvant est distillé et on recueille 16 g de produit que l'on chromatographie sur alumine à 56°.

Chromato. N° 18

Fraction neutre de la cire	16 g
Alumine II	300 g
Elution par fractions de	200 ml

1.	Tétrachlorure de carbone	50 mg
2.	"	730
3.	"	236
4.	"	85
5.	Tétrachlorure-benzène 9:1	19
6.	" 4:1	23
7.	" 1:1	42
8.	"	38
9.	Benzène	29
10.	"	42
11.	"	52
12.	"	81
13.	"	117
14.	"	112
15.	"	106
16.	Benzène - méthanol 99:1	81
17.	"	102
18.	"	236
19.	"	2186
20.	"	264
21.	"	293
22.	Benzène - méthanol 9:1	1242
23.	"	1344
24.	"	395
25.	"	207
26.	Chloroforme-ac. acétique 1 %	241
27.	"	78
28.	Chloroforme-ac. acétique 2 %	1014
29.	"	2346
30.	"	215
31.	"	284
Total		12,280 g

Les éluats 2 et 3 constituent la fraction I

Les éluats 12 à 18 constituent la fraction II

L'éluat 19 constitue la fraction III

Les éluats 20 à 27 constituent la fraction IV.

1°/ Fraction I

507 mg dissous dans 10 ml de benzène sont saponifiés pendant 36 heures par 10 ml de potasse méthanolique à 10 %.

Après acidification par HCl 6 N le produit saponifié en solution benzénique est passé sur une colonne de 20 g de carbonate de

sodium maintenue à 56°: on sépare ainsi 107 mg d'acides et 323 mg d'alcools.

Etude de la partie acide. Les acides (107 mg) dissous dans le benzène sont méthylés par le diazométhane dans l'éther et les esters méthyliques sont purifiés sur alumine à 56°.

On obtient une poudre blanche qui a le spectre infrarouge d'un ester méthylique d'acide gras saturé. La chromatographie en phase gazeuse est faite par programmation de 185° à 320°, les esters étant dissous dans le dioxanne à 50°.

Etude de la partie alcool. Les alcools obtenus par saponification de la fraction I ont l'aspect d'un solide jaune, légèrement pâteux, ils sont rechromatographiés sur alumine.

Chromato. N° 19

Alcools de la fraction, I	323 mg
Alumine II	8 g
Elution par fractions de	20 ml
1. Hexane	10 mg
2. "	5
3. "	26
4. "	24
5. "	15
6. "	12
7. "	10
8. "	44
9. "	47
10. "	3
11. Hexane - Benzène 4:1	4
12. Benzène	3
13. "	1
14. "	0
15. Benzène - alcool absolu 9 : 1	36
16. "	6
17. "	3
18. Benzène - alcool absolu 1:1	1
19. "	1
Total	251 mg

Les éluats 4 à 8 sont une poudre blanche, et possèdent le spectre

infra-rouge des alcools primaires saturés à longue chaîne : ils sont réunis et chromatographiés en phase gazeuse en solution dans le dioxanne à 50°

2°/ Fraction II

Les éluats 12 à 18 de la chromatographie n° 18 sont réunis et recristallisés 3 fois dans l'acétate d'éthyle.

La chromatographie en phase gazeuse est faite par programmation de 180° à 290°, la fraction étant dissoute dans le dioxanne à 50°.

3°/ Fraction III

L'éluat 19 de la chromatographie n°18 est chromatographié sur alumine à 56°.

Chromato. N° 20

Chromato. n° 18, fr. 19 : 2,180 g
 Alumine II 40 g
 Elution par fractions de 100 ml

1.	Tétrachlorure de carbone-benzène 1:1	137 mg
2.	" "	254
3.	Benzène	171
4.	"	131
5.	Benzène - méthanol 5 %	886
6.	"	37
7.	Benzène - méthanol 10 %	12
8.	"	15
9.	Chloroforme - ac.acétique 2 %	28
Total		1,671 g

L'éluat n°1 est un alcool avec un peu d'ester comme impureté, tandis que les éluats 2 à 4 sont identiques à la fraction II. Les éluats suivants sont jaunes et pâteux.

4°/ Fraction IV

Les éluats 23 à 27 de la chromatographie n° 18 sont réunis et l'on a ainsi 3,507 g d'un solide jaune.

Saponification . 880 mg en solution dans le benzène sont saponifiés par la potasse méthanolique à 10 % pendant 60 heures; on sépare de la manière habituelle 750 mg d'alcools, jaunes, pâteux, pour seulement 144 mg d'acides sous forme d'une poudre jaune.

CHAPITRE V

ETUDE DES CIRES DE DIVERS COCCIDES

A. RESULTATS OBTENUS

Nous avons vu dans le premier chapitre que la cire est une sécrétion constante chez tous les Coccidés et que la forme et la consistance de celle-ci déterminent en partie la classification des cochenilles. Nous avons déjà mentionné (chapitre IV) les travaux sur la composition chimique des cires des Coccidés, tous sont anciens et les résultats assez imprécis.

En utilisant la chromatographie gaz-liquide et les techniques que nous avons mises au point pour la cire de Gascardia madagascariensis nous nous sommes proposés de revoir la composition de la cire des Indes et de la cire de Chine secrétées respectivement par deux cochenilles exotiques, Laccifer lacca et Ceroplastes ceriferus. Nous avons examiné aussi 4 autres cires appartenant aux trois familles de Coccidés : une Margarodidae Iceria purchasi Mask., une Diaspididae Quadraspidiotus perniciosus Comst. ou Pou de San José, et 2 Lecanidae Ceroplastes rusci et Pulvinaria floccifera.

Dans ce chapitre nous avons groupé les cochenilles d'après leur provenance, les cochenilles exotiques et les cochenilles européennes (*), mais pour ces dernières les méthodes ont

(*) Nous remercions vivement Monsieur C. Benassy, directeur de la station de Zoologie agricole et de lutte biologique d'Antibes, qui a eu l'amabilité de nous procurer ces cochenilles.

dû être adaptées à une échelle microanalytique car nous ne disposons que de quelques individus de chaque espèce.

1. Les cires de Laccifer Lacca et Ceroplastes Ceriferus

Malgré leur importance commerciale la composition chimique des cires de Ceroplastes (Coccus) ceriferus et Laccifer (Tachardia ou Carteria) lacca est mal connue car les études sont dispersées et assez anciennes.

C'est à partir de la gomme-laque des Indes, secrétée par la cochenille Laccifer lacca que l'on extrait la "shellac wax" constituée en majeure partie de cires. Déjà en 1816 John (183) sépare la gomme-laque en plusieurs parties et isole 1,67 % de matières cireuses. Puis Benedikt et al. (184) commencent une étude de cette cire qui est reprise par Gascard (32)(34)(185): il identifie des alcools primaires et des acides gras en C_{26} , C_{30} et C_{32} . En 1926 Tschirch et Schäfer (186) isolent aussi l'acide cérotique et un hydrocarbure (F. 54°-55°) qu'ils nomment la tachardiacerine. Enfin Chibnall et Piper (42) trouvent les alcools de C_{26} à C_{36} et les acides de C_{30} à C_{34} à nombre pair d'atomes de carbone. Warth (144) signale en plus deux hydrocarbures, le penta-cosane et l'hentriacontane.

Les études sur la cire de Ceroplastes ceriferus sont aussi assez anciennes: en 1897 Henriques (29) trouve de l'hexacosanol et de l'acide hexacosanoïque, mais en 1930 Chibnall et Piper (42) démontrent que ces composés sont en réalité un mélange des alcools et des acides en C_{26} , C_{28} et C_{30} ; et par distillation fractionnée Collins (54) identifie en plus l'acide tétracosanoïque dans le mélange d'acides.

Composition chimique des cires

La cire des Indes commerciale est un solide jaunâtre qui contient quelques résines extraites par des épuisements

successifs à l'acétone, tandis que la cire de Chine parfaitement blanche a été utilisée sans purification préalable.

Deux saponifications et un passage sur carbonate de sodium séparent les acides de l'insaponifiable. Ce dernier est chromatographié sur alumine et donne des hydrocarbures et des alcools primaires; les acides, méthylés par le diazométhane puis chromatographié sur alumine, ne contiennent que des acides normaux.

Le Tableau XI indique les pourcentages des hydrocarbures, alcools et acides des 2 cires, le Tableau XII donne leur composition complète obtenue après chromatographie en phase gazeuse de chaque groupe de constituants.

TABLEAU XI

Constituants des cires en % de la cire totale

Cochenilles	Hydrocarbures	Alcools	Acides non hydroxylés
<u>Laccifer lacca</u>	1,8	77,2	21,0
<u>Ceroplastes ceriferus</u>	2,6	47,4	50,0

Si nous comparons nos résultats avec ceux des études antérieures nous constatons que les constituants déjà isolés de la cire de Chine existent en très forte proportion alors que les constituants mineurs n'avaient pas été décelés étant donné l'imprécision des techniques employées précédemment. Nous avons également trouvé tous les hydrocarbures de C_{25} à C_{35} , l'hentriacontane et le tritriacontane étant nettement prédominants, or seul l'heptacosane avait été signalé par Warth (144).

Pour la cire des Indes nos conclusions sont assez différentes des résultats antérieurs: s'il y a seulement une très faible quantité d'hexacosanol, l'octacosanol jamais

TABLEAU XII

Constituants des cires des Coccidés en % de chaque groupe

Nombre d'atomes de Carbone	Ceroplastes ceriferus			Tachardia lacca		
	Hydro- carbures	Alcools	Acides	Hydro- carbures	Alcools	Acides
10	...	...	...	...	...	0,1
11	...	...	...	...	...	0,2
12	...	...	...	...	...	0,1
13	...	...	...	...	...	0,3
14	...	...	6,9	...	...	1,0
15	...	...	...	...	...	...
16	...	...	2,4	...	...	3,4
17	...	...	...	...	...	...
18	...	...	3,4	...	...	0,4
19	...	...	...	...	...	...
20	...	...	traces	...	...	0,3
21	...	...	...	...	...	...
22	...	...	1,2	...	...	0,2
23	...	...	...	...	...	...
24	...	7,0	14,4	...	...	0,2
25	3,9	...	...	...	...	...
26	0,6	63,0	49,0	...	0,6	0,3
27	5,2	...	...	42,0	...	1,2
28	1,0	28,0	15,5	4,1	66,6	18,9
29	7,6	...	...	35,1	...	1,7
30	2,7	2,0	5,6	2,8	21,0	25,1
31	42,1	...	...	13,4	...	1,1
32	1,0	...	1,5	traces	9,0	27,2
33	29,2	...	...	2,6	...	0,2
34	0,5	...	...	...	2,8	17,6
35	6,2	...	...	...	...	...
36	...	...	...	...	...	0,5

identifié auparavant constitue 66,6 % des alcools totaux; il en est de même pour l'acide hexacosanoïque alors que l'acide octacosanoïque représente 18,9 % des acides totaux. D'autre part nous ne retrouvons pas de pentacosane mais l'heptacosane et le nonacosane sont beaucoup plus importants que l'hentriacontane.

2. Les cires de Icerya Purchasi, Ceroplastes Rusci, Pulvinaria floCIFera et quadraspidiotus perniciosus .

Extraction des cires

Les insectes sont séchés sous vide pendant 3 heures et les cires sont extraites en traitant les cochenilles sous reflux par l'hexane. Après filtration à chaud les cires sont purifiées par l'acétone selon la technique décrite pour la cire de Gascardia madagascariensis, on obtient des composés blancs, facilement pulvérisables. Le poids de cires obtenu et leur pourcentage par rapport au poids total de l'insecte est indiqué dans le Tableau XIII.

TABLEAU XIII

Poids et pourcentage de cires par rapport au poids total de l'insecte

	<u>I.purchasi</u>	<u>C.rusci</u>	<u>P.flocifera</u>	<u>Q.perniciosus</u>
Poids de cires(g)	0,42	1,6	0,3	0,2
% de cires	19 %	20 %	30 %	13 %

Composition des cires

Les cires saponifiées sont passées sur carbonate de sodium selon la technique habituelle. L'insaponifiable chromatographié sur alumine donne pour chaque cire des hydrocarbures élués par le tétrachlorure de carbone et des alcools primaires élués par le mélange tétrachlorure de carbone-benzène 1:1.

Les acides gras sont méthylés par le diazométhane et les esters chromatographiés sur alumine se séparent en une ou deux fractions: le mélange hexane-benzène 1:1 élue des esters méthyliques non hydroxylés tandis que le mélange benzène-éthanol 9:1 élue des esters méthyliques d'hydroxyacides.

Le Tableau XIV montre le pourcentage des différentes fractions obtenues pour chaque cire.

TABLEAU XIV

Constituants des cires en pourcentage de la cire totale

Cochenille	Hydrocarbures	Alcools	Acides n.	Hydroxyacides
I. purchasi	26,9	32,3	31,4	9,4
C. rusci	11,8	23,6	64,6	0
P. floccifera	8,3	39,2	32,2	20,3
Q. perniciosus	9,8	14,7	75,5	0

Chaque fraction est chromatographiée en phase gazeuse sur Silicone rubber par programmation et les résultats trouvés sont indiqués dans le Tableau XV (pages 106 et 107).

Seule la cire d'Icerya purchasi avait été étudiée précédemment par Kono et Maruyama en 1935 (143): là encore l'absence de technique précise d'analyse explique la différence entre leurs résultats et les nôtres. Ils identifient en effet des alcools à 14, 16, 18 et 24 atomes de carbone à côté d'une quantité importante d'hexacosanol. Nous avons retrouvé l'acide hexacosanoïque mais il semble bien que l'acide palmitique qu'ils trouvent en forte proportion (27 % des acides totaux) ait été en fait un mélange.

B. DESCRIPTION DES EXPERIENCES

1. La cire de Laccifer Lacca

150 g de cire commerciale sont mis sous reflux avec 3 litres d'acétone. Par refroidissement il apparaît un important précipité blanc qui est séparé par filtration sur Büchner. Ce précipité est traité 2 fois par l'acétone dans les mêmes conditions et on récupère finalement 100 g de cire purifiée, facilement pulvérisable.

Saponification

30 g de cire dissous dans 300 ml de benzène sont saponifiés par 300 ml de potasse méthanolique à 10 % pendant 24 heures. Après passage sur une colonne de 150 g de Na_2CO_3 on isole la fraction neutre non retenue par le carbonate; le spectre infrarouge montre encore une bande ester, on saponifie donc à nouveau cette fraction pendant 64 heures.

On sépare ainsi 19,840 g d'insaponifiable et 5,310 g d'acides.

Etude de l'insaponifiable

Il est chromatographié à 56° sur alumine.

Chromato. N°21

Insaponifiable	3,560 g
Alumine II	63 g
Elution par fractions de	100 ml
1. Hexane	54 mg
2. "	8
3. "	48
4. "	67
5. Hexane - Benzène 9:1	515
6. "	<u>435</u>

A Reporter.... 1127 mg

TABLEAU XV

Constituants des cires en pourcentage

Nombre d'atomes de Carbone	<u>Icerya purchasi</u>			<u>Ceroplastes rusci</u>		
	Hydro- carbures	Alcools	Acides <u>n</u>	Hydro- carbures	Alcools	Acides <u>n</u>
14	...	...	...	...	...	...
16	4.7	...	1.1	...	...	1.9
18	...	...	4.7	...	...	4.2
20	...	...	6.1	...	...	5.7
22	...	0.9	9.4	...	...	...
24	...	7.3	7.4	...	7.3	1.4
25	0.8	...	...	1.0	...	...
26	...	49.2	36.4	1.0	81.2	1.2
27	7.8	...	...	58.0	...	...
28	...	33.8	22.7	2.7	11.5	0.9
29	50.4	...	...	26.4	...	...
30	...	8.8	10.7	1.7	...	15.2
31	32.3	...	...	9.2	...	...
32	...	...	1.1	...	...	56.3
33	8.4	...	...	...	...	...
34	...	...	0.4	...	...	13.2
35	0.3	...	...	...	...	...

* Les hydrocarbures de Pulvinaria floccifera renferment à côté des substances, sans doute des hydrocarbures ramifiés, représentant volumes de rétention correspondent à ceux des hydrocarbures anteiso

des composés de chaque groupe

<u>Pulvinaria floccifera</u>			<u>Quadraspidiotus perniciosus</u>		
Hydrocarbures [*]	Alcools	Acides <u>n</u>	Hydrocarbures	Alcools	Acides <u>n</u>
...	...	2.5	...	...	...
...	...	11.7	...	...	14.7
...	...	1.9	...	...	4.4
...	...	1.8	...	...	4.7
...	...	1.0	...	0.4	2.9
...	...	1.7	...	2.7	8.0
3.3	...	...	...	...	...
...	4.1	2.9	...	77.8	12.5
10.6	...	...	1.1	...	...
...	50.3	48.2	...	19.1	26.4
33.6	...	...	5.9	...	...
...	35.9	19.8	...	...	12.5
17.2	...	...	72.1	...	...
...	9.7	8.0	2.7	...	12.5
3.9	...	...	18.2	...	...
...	...	0.5	...	...	1.4
...	...	...	...	...	...

composés linéaires identifiés par chromatographie gaz-liquide trois respectivement 6.8 %, 20.1 % et 4.5 % des hydrocarbures totaux. Leurs en C₂₇, C₃₁ et C₃₃.

	Report	1,127 mg
7. Hexane-Benzène 9:1		320
8. "		211
9. "		168
10. Hexane-Benzène 4:1		145
11. "		105
12. Hexane-Benzène 1:1		43
13. "		170
14. Benzène		183
15. "		89
16. Benzène-éthanol 99:1		165
17. " "		284
18. " "		89
19. Benzène-éthanol 1:1		38
20. " "		<u>15</u>
Total		3,152 g

L'éluat n°1 est un solide blanc F.61°. Son spectre infra-rouge est celui d'un hydrocarbure saturé qui est étudié par chromatographie en phase gazeuse avec programmation de 190° à 300°.

Les éluats 5 à 14, sont réunis. Après 2 reprécipitations dans l'acétate d'éthyle cette fraction a un point de fusion de 82°5 et le spectre infra-rouge d'un alcool primaire saturé à longue chaîne. La chromatographie en phase gazeuse sur Silicone rubber avec programmation de 185° à 310° permet d'identifier les alcools.

Etude des acides

680 mg de la fraction acide dissous dans 15 ml de benzène sont méthylés par le diazométhane dans l'éther à 35°. Les esters méthyliques obtenus sont chromatographiés sur alumine à 56°.

Chromato. N°22

Esters méthyliques	670 mg
Alumine II	20 g
Elution par fractions de	50 ml

1.	Hexane	391 mg
2.	"	80
3.	"	19
4.	"	5
5.	Hexane - Benzène 1:1	2
6.	"	3
7.	Benzène	3
8.	Benzène - méthanol 9:1	43
9.	"	11
10.	Chloroforme-ac. acétique 2 %	55
11.	"	9
Total		621 mg

Les éluats 1 à 3, après reprecipitation dans l'acétate d'éthyle, ont l'aspect d'une poudre blanche, F. 71°. Ce sont des esters méthyliques non hydroxylés dont la chromatographie en phase gazeuse est effectuée sur Silicone rubber 20 % par programmation de 160° à 320°.

2. La cire de Coccus Ceriferus

5 g de cire dissous dans 50 ml de benzène sont saponifiés sous reflux par 50 ml de potasse méthanolique à 10 % pendant 4 jours. Après passage sur 130 g de Na_2CO_3 , la fraction neutre qui présente encore une bande ester par spectrographie infra-rouge est saponifiée à nouveau dans les mêmes conditions pendant 4 jours: on sépare alors 1,720 g d'insaponifiable et 1,700 g d'acides.

Etude de l'insaponifiable

Il est chromatographié sur alumine à 56°

Chromato. N°23

Insaponifiable	1,720 g
Alumine II	40 g
Elution par fractions de	100 ml
1. Hexane	17 mg
2. "	17
3. "	3
4. Hexane - Benzène 9:1	35
5. "	218
6. Hexane - Benzène 9:1	320
7. "	251
8. "	121
9. "	85
10. Benzène	91
11. "	74
12. "	53
13. Benzène - Méthanol 9:1	142
14. "	16
	1,453 g

Les éluats 1 et 2 qui ont le spectre infra-rouge d'un hydrocarbure saturé sont chromatographiés en phase gazeuse sur Silicone rubber 20 % par programmation de 185° à 300°.

Les éluats 5 à 11 réunis et reprecipités dans l'acétate d'éthyle sont des alcools primaires saturés chromatographiés en phase gazeuse dans les mêmes conditions que l'éluat n°1.

Etude des acides

Les acides (1,700 g) dissous dans 20 ml de benzène sont méthylés par le diazométhane en solution étherée à 35°: les esters méthyliques sont alors chromatographiés sur alumine à 56°

Chromato. N°24

Esters méthyliques	1,720 g
Alumine II	32 g
Elution par fractions de	100 ml

1.	Hexane	1,466 g
2.	"	121 mg
3.	"	39
4.	"	9
5.	Hexane - Benzène 1:1	13
6.	Benzène	5
7.	Benzène - méthanol 99:1	45
8.	"	5
Total		<u>1,702 g</u>

L'éluat n°1 est reprecipité 2 fois dans l'acétone avant d'être chromatographié en phase gazeuse sur Silicone rubber 20 % avec programmation de 200° à 300°.

3. Cire des coccidés européennes

Nous donnerons une seule description, tous les essais sur les différentes cochenilles européennes ayant été réalisés suivant la même méthode, le poids de cire disponible varie de 0,2 g à 1,6 g.

Nous décrivons ici l'étude d'Icerva purchasi

2,210 g d'insectes sont traités par 100 ml d'hexane sous reflux pendant 20 heures: après filtration à chaud l'hexane est évaporé et le résidu purifié plusieurs fois à l'acétone bouillant fournit 420 mg de cire.

Saponification

La cire est saponifiée dans 80 ml du mélange benzène-potasse méthanolique 10 % 1-1 pendant 7 jours. La cire saponifiée dissoute dans le benzène et passée sur 20 g de Na_2CO_3 donne 169mg d'insaponifiable et 152 mg d'acides.

Etude de l'insaponifiable

Il est chromatographié sur alumine.

Chromato. N°25

Insaponifiable	169 mg
Alumine II	6 g
Elution par fractions de	20 ml
1. Tétrachlorure de carbone	8 mg
2. "	73
3. "	32
4. "	14
5. Tétrachlorure-benzène 1:1	10
6. Benzène	18
7. "	2
8. Benzène - éthanol 9:1	7
9. "	4
Total	168 mg

Les éluats 1 et 2 qui ont le spectre infra-rouge des hydrocarbures saturés sont réunis et chromatographiés en phase gazeuse.

Les éluats 3 à 7 réunis, reprecipités de l'acétate d'éthyle, ont le spectre d'un alcool primaire à longue chaîne saturé: ils sont aussi chromatographiés en phase gazeuse sur Silicone rubber.

Etude des acides

Les acides (152 mg) méthylés par le diazométhane sont chromatographiés sur alumine.

Chromato. N°26

Esters méthyliques	155 mg
Alumine II	6 g
Elution par fractions de	20 ml
1. Hexane	1 mg
2. "	21
3. Hexane - Benzène 1:1	68
4. "	4
5. Benzène	2

6.	Benzène	2 mg
7.	Benzène - éthanol 9:1	20
8.	"	7
9.	Benzène - éthanol 1:1	1
10.	Chloroforme - ac.acétique	1
	1 %	
		126 mg

Les éluats 1 à 6 sont reprecipités dans l'acétate d'éthyle et réunis: ce sont des esters méthyliques saturés.

Les éluats 7 à 9 sont aussi réunis: leur spectre infra-rouge est celui d'un hydroxyester saturé. Sa trop faible quantité ne nous a pas permis de l'étudier.

CONCLUSIONS

Nous avons déterminé la composition de la cire de Gascardia madagascariensis. Après hydrolyse nous avons identifié les hydrocarbures, alcools et acides présents, nous avons ensuite recherché la nature et la proportion d'alcools et d'acides présents sous forme libre et sous forme d'esters.

Nous avons ainsi obtenu la composition de la cire de Gascardia madagascariensis et la longueur de chaîne moyenne de 30 atomes de carbone pour les constituants permet de la classer parmi les cires dures.

Les hydroxyacides qu'elle contient appellent quelques remarques :

- un pourcentage aussi élevé d'acides hydroxylés (33,4 %) est inhabituel dans une cire animale,

- c'est en outre la première fois à notre connaissance qu'une cire possède des hydroxyacides à 30, 32 et 34 atomes de carbone ayant le groupement -OH vers le milieu de la chaîne carbonée, la position courante étant en α , ω et plus rarement β (144).

La chromatographie en phase gazeuse se révèle une technique indispensable pour l'étude des cires: nous avons en effet prouvé au cours de la première partie de notre travail que la méthode de Piper et Chibnall était valable mais incapable de donner la composition totale d'une cire.

La chromatographie gaz-liquide n'avait pas encore été utilisée pour les cires de Coccidés mais nous croyons avoir démontré qu'elle permet une étude rapide et précise même si le poids de cire disponible est inférieur au gramme. Six autres cires de Coccidés ont ainsi été étudiées, celles de Laccifer lacca, Ceroplastes ceriferus, Icerya purchasi, Ceroplastes rusci,

Pulvinaria floCIFera et Quadraspidiotus perniciosus : parmi ces cires les 3 dernières n'avaient encore fait l'objet d'aucune recherche, les trois autres étaient partiellement connues mais les quelques résultats existants étaient anciens.

*

*

*

Nous espérons que l'étude de la cire de Gascardia madagascariensis nous permettrait de confirmer le nom de Ceroplastes madagascariensis T.T. que Mamet propose pour cette cochenille comme synonyme de Gascardia(130). Or sa composition est assez différente de celle de deux autres Ceroplastes que nous avons pu étudier: si les hydrocarbures et les alcools sont semblables il n'en est pas de même pour les acides puisque Ceroplastes rusci et Ceroplastes ceriferus ne possèdent pas d'hydroxyacides dans leurs cires.

Nous pouvons seulement affirmer d'un point de vue chimique que Gascardia madagascariensis n'est pas une Lacciferinae ou cochenille à laque comme Targioni-Tozzetti le pensait(127). Les cochenilles de cette sous-famille sont caractérisées par leur sécrétion de laque connue sous le nom de "shellac"; or la shellac contient un acide aliphatique trihydroxylé, l'acide aleuritique, et un acide sesquiterpénique, l'acide shellolique (187)(188), que nous n'avons jamais pu isoler de la résine de Gascardia madagascariensis : le seul produit cristallisé qu'elle contient est un sesterpène, l'acide gascardique (189).

*

*

*

Nos résultats indiquent une grande similitude dans la composition des cires de cochenilles d'espèces très différentes ,

les 7 cires étudiées proviennent des trois familles de cochenilles: Margarodidae, Lecanidae, Diaspididae et Icerya purchasi, représente un type très primitif par rapport à Quadraspidiotus perniciosus. La présence d'hydroxyacides n'est pas non plus liée à un facteur phylogénique puisqu'on en trouve chez un Margarodidae et chez seulement 2 Lecanidae sur 5.

Il n'y a d'autre part pas de différences notables entre la composition des cires exotiques et européennes, cependant il semblerait intéressant d'analyser les cires des végétaux sur lesquels vivent les Coccidés afin de voir si ces dernières ont un rôle dans la biogénèse des constituants des cires des cochenilles.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) A. BALACHOWSKY, Les Cochenilles de France, d'Europe, du nord de l'Afrique et du bassin méditerranéen. Hermann, Paris 1937.
- (2) C. BENASSY, Ann.Biol. 1961, 7, fasc.9-12, 321-41
- (3) P. PESSON, Traité de Zoologie: anatomie, systématique, biologie, publié sous la direction de P.Grassé. Masson, 1951, 10, 1456.
- (4) P.F. POLLISTER, Quart.Journ. Microsc.Sci., 1938, 80, 127
- (5) P. ROTA, Boll.Zool.Agr.Bacchic. Milano, 1955, 21, 231
- (6) R.C. DICKSON, Ann.Ent.Soc.Am., 1951, 44, 596
- (7) C. DISSELKAMP, Höfchen - Briefe, 1954, 7, 106
- (8) R. MATHESON, Ann.Ent.Soc.Am., 1923, 16, 50
- (9) K. SULC, Acta Soc.Scient.Nat.Moravicae, Brno, 1932, 1, 134
- (10) A. BALACHOWSKY, M. MESNIL, Les insectes nuisibles aux plantes cultivées: leurs moeurs, leur destruction, Méry, Paris, 1935
- (11) LAVOISIER, Mémoires de l'Académie des Sciences, 1784, 593
- (12) G. DAMOY, Thèse Pharmacie, Paris, 1924
- (13) GAY-LUSSAC, Ann.Chim.Phys. 1811, 74, 189
- (14) T. de SAUSSURE, Ann.Chim.Phys.(2) 1820, 13, 337
- (15) C. OPPERMANN, Ann.Chim.Phys.(2) 1832, 49, 240
- (16) H. HESS, Ann. der Chem.und Pharm. 1838, 27, 3
- (17) F. JOHN, Tableaux chimiques du règne végétal 1814
- (18) E. CHEVREUL, Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale. Paris 1823
- (19) BOUDET, BOISSENOT, J.de Phys.et de Chim., 1827, 13, 38
- (20) C. BROMEIS, Ann.Chim.Phys.(3) 1841, 3, 118
- (21) B. LEWY, Ann.Chim.Phys.(3) 1845, 13, 438
- (22) C. GERHARDT, Ann.Chim.Phys.(3) 1845, 15, 236
- (23) DUMAS, MILNE-EDWARDS, Ann.Chim.Phys.(3) 1845, 14, 400
- (24) LEWY, C.R. Acad.Sc. 1843, 16, 697
- (25) DESCHAMPS, J. de Phys.et de Chim. 1843, 4, 205

- (26) B.C. BRODIE, Ann. der Chem.und Pharm. 1848, 67, 180
- (27) B.C. BRODIE, Ann. der Chem.und Pharm. 1849, 71, 144
- (28) C. LIEBERMANN, Ber. 1885, 18, 1975
- (29) R. HENRIQUES, Ber. 1897, 30, 1415
- (30) J. BOUGAULT, L. BORDIER, J.de Pharm. et de Chim.(6), 1909, 29, 561
- (31) J. BOUGAULT, C.R. Acad.Sc. 1910, 150, 874
- (32) A. GASCARD, Thèse Pharmacie, Paris 1893
- (33) N.S. MASKELYNE, Bull.Soc.Chim.Paris 1869, 12, 382
- (34) A. GASCARD, C.R.Acad.Sc. 1914, 159, 258
- (35) M.T. MARIE, Bull.Soc.Chim.(3^e série) 1896, 15, 510
- (36) A. GASCARD, C.R. Acad.Sc. 1920, 170, 1326
- (37) W. HUMINSKY, Rocznikik Chem. 1935, 15, 53 (Chem.Abstr.1935, 29, 4613)
- (38) A. GASCARD, Thèse Doctorat, Paris 1920
- (39) A. GASCARD, G. DAMOY, C.R.Acad.Sc., 1923, 177, 1222 et 1442
- (40) S.H. PIPER, A.C. CHIBNALL, S.J.HOPKINS, A.POLLARD, J.A.B.SMITH, E.F. WILLIAMS, Biochem. J. 1931, 25, 2072
- (41) S.H. PIPER, A.C. CHIBNALL, E.F. WILLIAMS, Biochem.J., 1934, 28, 2175
- (42) A.C. CHIBNALL, S.H. PIPER, A. POLLARD, E.F. WILLIAMS, P.N. SAHAI, Biochem. J. 1934, 28, 2189
- (43) A. POLLARD, A.C. CHIBNALL, S.H. PIPER, Biochem.J., 1931, 25, 2111
- (44) A. POLLARD, A.C. CHIBNALL, S.H. PIPER, Biochem.J., 1933, 27, 1889
- (45) A. C. CHIBNALL, E.F. WILLIAMS, A.L. LATNER, S.H. PIPER, Biochem.J., 1933, 27, 1885
- (46) H.A. SCHUETTE, J.G. BALDINUS, J.Am.Oil.Chem.Soc., 1949, 26, 530
- (47) H.A. SCHUETTE, J.G. BALDINUS, J.Am.Oil Chem.Soc., 1949, 26, 651
- (48) H.A. SCHUETTE, M.H. KHAN, J.Am.Oil Chem.Soc., 1953, 30, 126
- (49) L. SAVIDAN, Thèse Doctorat, Paris, 1954
- (50) N. WIEDENHOFF, J.Am.Oil Chem.Soc., 1959, 36, 297
- (51) J.L. DALTON, H.L. MITCHELL, J.Agr.Food Chem., 1959, 7, 570
- (52) D. HOLDE, W. BLEYBERG, Metallbörse, 1930, 20, 1855
- (53) F. FRANCIS, S.H. PIPER, T. MALKIN, Proc.Roy.Soc.London(2), 1930, 128 A, 214
- (54) F.J.E. COLLINS, J.Soc.Chem.Ind., 1935, 54, 33 T
- (55) A.W. WEITKAMPF, J.Am.Chem.Soc., 1945, 67, 447

- (56) R.W. WEITKAMPF, L.C. BRUN STRUM, Oil and Soap, 1941,18, 47
- (57) W.N. AXE, A.C. BRATTON, J.Am.Oil Chem.Soc.,1937,59,1424
- (58) A.W. WEITKAMPF, A.M. SMILJANIC, S. ROTHMAN, J.Am.Chem.Soc.,
1947, 69, 1936
- (59) K.E. MURRAY, J.Am.Oil Chem.Soc., 1951, 28, 235
- (60) K.E. MURRAY, R. SCHOENFELD, J.Am.Oil Chem.Soc.,1951,28,461
- (61) K.E. MURRAY, R. SCHOENFELD, Austr.J.Chem.,1955, 8 , 432
- (62) K.E. MURRAY, R. SCHOENFELD, J.Am.Oil Chem.Soc.,1953,30, 25
- (63) K.E. MURRAY, R. SCHOENFELD, Austr.J.Chem.,1955, 8, 437
- (64) K.E. MURRAY, R. SCHOENFELD, Austr.J.Chem.,1955, 8, 424
- (65) K.E. MURRAY, R. SCHOENFELD, J.Am.Oil Chem.Soc.,1952,29,416
- (66) W. BERGMANN, S.M. CREIGHTON, W.M. STOKES, J.Org.Chem.,1956,
21, 721
- (67) V.R. MHASKAR, A.B. KUCKARNI, J.Sci.Ind.Research,1957,16 B,
374
- (68) R.R. BRENNER, M. SLOVINSKI, J.M. PAZ, O.MERCURI,M.T. LENCI,
An. As. Quim. Argentina, 1958, 46, 336
- (69) R.R. BRENNER, J.H. FIORD, An.As. quim. Argentina, 1959,47,
19
- (70) D.H.S. HORN, J.Sc.Food and Agricultural, 1958,9,632
- (71) T.W. FINDLEY, J.B. BROWN, J.Am.Oil Chem.Soc.,1953, 30, 291
- (72) L.J.N. COLE, J.B. BROWN, J.Am.Oil Chem.Soc., 1960, 37, 359
- (73) A.J. HOWARD, D. HAMER, J.Am.Oil Chem.Soc.,1962, 39, 250
- (74) A.R. GILBY, A.E. ALEXANDER, Archiv.Biochem.Biophys.1957,67
- (75) A.R. GILBY, Archiv.Biochem.Biophys.1957, 67, 307 et 302
- (76) M. NILSSON, R. RYNAGE, E.von SYDOW,Acta Chemica Scand.1957,
11, 634
- (77) R.A. BROWN, W.S. YOUNG, N. NICOLAIDES, Anal.Chem.1954,26,
1653
- (78) G.G. WANLESS, W.H. KING, J.J. RITTER, Biochem.J.,1955,59,684
- (79) J.D. WALDRON, D.S. GOWER, A.C. CHIBNALL, S.H. PIPER,
Biochem.J., 1961, 78, 435
- (80) J. TISHER, E. ILLNER, Fette und Seifen , 1940, 47, 578
- (81) W. FUCHS, A. JONG, Fette und Seifen, 1954, 56 , 218
- (82) D.N. HELLIER, Chem. and Ind., 1959, 260
- (83) G. BAKER, J.H. PEPPER, L.H. JONHSON, E. HASTINGS, J.Insect
Physiol., 1960, 5 , 47

- (84) D.G. SPENGER, G. HAUF, Fette, Seifen Anstr. 1957, 7, 509
- (85) L.S.C. LAFFIN DE BADIN, R.R. BRENNER, An.As.quim.Argentina, 1958, 46, 318
- (86) V. WOLLRAB, M. STREIBL, F. SORM, Chem.and Ind., 1962, 40, 1762
- (87) L.J.N. COLE, Thèse Ohio State University, Colombus 1956
- (88) P. MAZLIAK, C.R. Acad.Sc., 1960, 251, 2393
- (89) P. MAZLIAK, J.Agr.Trop. et Bot.appl. 1961, 8, 180
- (90) P. MAZLIAK, Phytochemistry 1962, 1, 79
- (91) R.M.B. Mac KENNA, V.R. WHEATLEY, A. WORMALL, J. Investigative Dermatology, 1950, 15, 33
- (92) R.M.B. Mac KENNA, V.R. WHEATLEY, A. WORMALL, Biochem.J., 1952, 52, 161
- (93) W. FUCHS, R. DIEBERG, Fette, Seifen, Anstr. 1956, 58, 826
- (94) L. SAVIDAN, Bull. Soc.Chim. 1956, 1, 64
- (95) R.T. HOLMAN, L. HAGDAHL, J.Biol.Chem., 1950, 182, 421
- (96) L.L. RAMSEY, W.I. PATTERSON, J.Assoc.Off.Agr.Chemistr., 1945, 28, 644
- (97) L.L. RAMSEY, W.I. PATTERSON, ibid. 1948, 31, 139 et 441
- (98) F.A. van den HEUVEL, D.R. VATCHER, Anal.Chem., 1956, 28, 838
- (99) J. BOLDINGH, Rec.Trav.chim. Pays Bas, 1950, 69, 247
- (100) H.P. KAUFMANN, B. DAS, Fette, Seifen Anstr. 1961, 63, 614
- (101) D.T. DOWNING, Z.H. KRANZ, J.A. LAMBERTON, K.E. MURRAY, A.H. REDCLIFFE, Austr. J. Chem., 1961, 14, 253
- (102) B. STOIANOVA-IVANOVA, E. KOLAROVA, C.R. Acad.Bulgare Sci, 1962, 15, 151 (Chem.Abstr. 1962, 57, 16775 g)
- (103) A.T. JAMES, A.J.P. MARTIN, Biochem. J., 1952, 50, 679
- (104) W. CARRUTHERS, R.A.W. JOHNSTONE, Nature, 1959, 184, 1131
- (105) P. MAZLIAK, C.R. Acad.Sc. 1961, 252, 1507
- (106) G. EGLINTON, R.J. HAMILTON, Nature, 1962, 193, 739
- (107) J.D. MOLD, R.K. STEVENS, R.E. MEANS, J.M. RUTH, Biochem. 1963, 2, 605
- (108) A.W. SPEARS, C.W. LASSITER, J.H. BELL, J.Gas Chromatography, 1963, april, 34
- (109) Z.H. KRANZ, J.A. LAMBERTON, K.E. MURRAY, A.H. REDCLIFFE, Austr. J. Chem., 1960, 13, 498
- (110) D.T. DOWNING, Z.H. KRANZ, K.E. MURRAY, Austr.J.Chem., 1960, 13, 80

- (111) D.R. HERWETT, P.J. KIPPING, P.G. JEFFERY, Nature, 1961, 192, 65
- (112) N. NICOLAIDES, J.investigative Dermatology, 1962, 607
- (113) Y. TOYAMA, H. HIRAI, J.Chem.Soc.Japan, 1951, 54, 293
- (114) J.E. COOPER, Nature, 1962, 193, 744
- (115) E. FAUROT-BOUCHET, G. MICHEL, J.Am.Oil Chem.Soc.1964, 41, 418
- (116) E. FAUROT-BOUCHET, G. MICHEL, Bull.Soc.Chim.Biol. sous presse
- (117) J.D. MOLD, R.K. STEVENS, R.E. MEANS, J.M. RUTH, Nature, 1963, 199, 283
- (118) G. BUCHNER, Fette und Seifen, 1937, 44, 205
- (119) Y. TOYAMA, H. HIRAI, Fette und Seifen, 1951, 53, 556
- (120) M. STEIGER, T. REICHSTEIN, Helv.Chim.Acta, 1938, 21, 546
- (121) T. REICHSTEIN, J.van EUW, Helv.Chim.Acta, 1938, 21, 1197
- (122) T. REICHSTEIN, C. MONTIGEL, Helv.Chim.Acta, 1939, 22, 1212
- (123) H. BROCKMANN, H. SCHODDER, Ber., 1941, 74, 73
- (124) H.P. BURCHFIELD, E.E. STORRS, Biochemical Applications of Gas. Chromatography Academic Press, New York, 1962
- (125) R. PAULLIAN, Faune de Madagascar.XIII. La zoogéographie de Madagascar et des îles voisines. Publication de l'Institut de recherche scientifique de Tananarive, 1961
- (126) de FLACOURT, Histoire de la grande isle de Madagascar, 1661
- (127) A. TARGIONI-TOZZETTI, supplément à la thèse de Gascard 1893. (réf. 32).
- (128) Mac GILLIVRAY, The Coccidae, Scarab. Company, Urbana, Illinois 1921
- (129) GREEN, The Coccidae of Ceylan, Dulau and Co, London, 1922
- (130) R. MAMET, Mémoires de l'Institut scientifique de Madagascar, 1951, 5, 213
- (131) J. de CORDEMOY, Gommess, résines d'origine exotique et végétaux qui les produisent, particulièrement dans les colonies françaises. Paris, 1900
- (132) R.H. HACKMAN, Archiv. Biochem.Biophys., 1951, 33, 50
- (133) O. MASAMI, Bull.Agr.Chem.Soc. Japan, 1928, 4, 123
- (134) I.I. DOMSKY, Dessert.Abstr. 1959, 19, 2736
- (135) T.BHOWNIK, Indian Lac Research Inst.1946, n°9(ds Chemical Abstracts 1947, 41, 4933 c)
- (136) V.H. RAUHALA, J.Am.Oil Chem.Soc., 1961, 38, 233

- (137) J. MARWEDEL, German Patent, 1943, 735.791
- (138) A. SOLER, G. GUSMAN, Anales real.soc.españa fis.y quim.
1954, 50 B, 769
- (139) TONG-HAN-TANG, YU-SIANG-CHAO, J.Chem.Eng.China, 1939, 6, 19
- (140) A.C. CHIBNALL, S.H. PIPER, A. POLLARD, J.A.B. SMITH,
E.F. WILLIAMS, Biochem. J., 1931, 25, 2095
- (141) R. OSTEUX, J. GUILLAUME, J. LATURAZE, J.of Chromatography
1958, 1, 70
- (142) M. KONO, R. MARUYAMA, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1934, 10, 1228
- (143) M. KONO, R. MARUYAMA, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1935, 11, 647
- (144) A.H. WARTH, The Chemistry and Technology of Waxes,
Reinhold Publishing Corporation, New-York, new 2 nd
printing 1956.
- (145) Y. FUNKE, Archiv.Pharm. 1921, 259, 93
- (146) M. KONO, R. MARUYAMA, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1939, 14, 697
et ibid. 1939, 15, 178
- (147) M. KONO, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1932, 8, 1150
- (148) A.C. CHIBNALL, H.A. el MANGOURI, S.H. PIPER, Biochem.J.,
1954, 58, 506
- (149) M. KITAMURA, T. OBARA, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1958, 32, 946
- (150) M. BRINI, Bull.Soc.Chim. 1955, 996
- (151) M. LIPSON, J. Council Sci.Ind.Research, 1940, 13, 273
- (152) E. SEOANE, Anal.Real.Soc.esp.Fis.y quim., 1962, 1, 69 et 75
- (153) M. BEEKER, Biochem. Z. 1931, 239, 235
- (154) A.C. CHIBNALL, A.L. LATNER, E.F. WILLIAMS, C.A. AYRE,
Biochem. J., 1934, 28, 313
- (155) B.K. BLOUNT, A.C. CHIBNALL, H.A. el MANGOURI, Biochem.J.,
1937, 31, 1375
- (156) BERGEN, D. Patent Application O.Z. 1940, 12.438
- (157) D. SWERN, W.E. PARKER, J.Am.Oil Chem.Soc., 1952, 29, 431 et
614
- (158) G. MICHEL, M. DESBORDES, Bull.Soc.Chim. 1954, 913
- (159) W.N. SUMERWELL, J.Am.Chem.Soc., 1957, 79, 3411
- (160) M. KONO, R. MARUYAMA, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1936, 12, 512 et
523
- (161) R. YAMAZAKI, G. OGAWA, J.Soc.Chem.Ind.Japan, 1941, 44, 241
- (162) M. KONO, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 1936, 12, 512 et 523

- (163) C.L. OGG, W.L. PORTER, C.O. WILLITS, *Anal.Chem.* 1945, 17, 394
- (164) R. KOYAMA, *J.Chem.Soc.Japan* 1933, 54, 1233
- (165) M. KONO, R. MARUYAMA, *J.Agr.Chem.Soc.Japan*, 1937, 13, 579
- (166) N. KANANIWA, T. ISONO, *Ann.Rept.Fac.Pharm.Kauazawa Univ.*
1953, 3, 17
- (167) C. TSUKAMOTO, N. NANAMORI, T. KANANIWA, *Ann.Rpt.Fac.Pharm.*
Kauazawa Univ. 1953, 3, 22
- (168) J.A. LAMBERTON, *Austr. J. Chem.* 1961, 14, 323
- (169) A. FUJITA, T. YOSHIKAWA, *J.Pharm.Soc.Japan* 1951, 71, 913
- (170) A. KIRMANN, L. DUHAMEL, *C.R.Acad.Sc.*, 1962, 254, 1303
- (171) D.H.S. HORN, F.W. HOUGEN, E.von RUDLOFF, D.A. SUTTON,
J. Chem.Soc., 1954, part I, 177
- (172) D.H.S. HORN, Y.Y. PRETORIUS, *Chem.and Ind.* 1956, 27
- (173) A.C. CHIBNALL, S.H. PIPER, E.F. WILLIAMS, *Biochem.J.*, 1936,
30, 100
- (174) C. ROBINSON, L.H. SMITH, *J.Chem.Soc.* 1936, 283 et 625
- (175) D. CROWFOOT, *J.Chem.Soc.*, 1936, 716
- (176) D.J. CLARK, H.H. HATT, W.J. TROYAN, *Austr.J.Appl.Sci.*, 1951,
2, 378
- (177) O.D. SHREVE, M.R. HEETHER, H.B. KNIGT, D. SWERN,
Anal. Chem., 1950, 22, 1498
- (178) I. KITAGAWA, M. SUGAI, F.A. KUMMEROW, *J.Am.Oil Chem.Soc.*,
1962, 39, 217
- (179) V. GRIGNARD, G. DUPONT, R. LOCQUIN, *Traité de chimie orga-*
nique, Masson et Cie, Paris 1935, Tome XI, fasc.1, p.62
- (180) M. MATIC, *Biochem.J.*, 1956, 63, 168
- (181) G.D. MEAKINS, R. SWINDELLS, *J.Chem.Soc.* 1959, 1044
- (182) F. FEIGL, *Spot tests*, Elsevier Publishing Co., New-York ,
1954
- (183) JOHN, *Ann.Chim.Phys.* 1816, 1, 445
- (184) R. BENEDIKT, E. EHRLICH, F. ULZER, *Monatshefte für Chemie*,
1888, 157
- (185) A. GASCARD, *J.de Pharm.et de Chim.*, 1886(5), 17, 506
- (186) A. TSCHIRCH, H.H. SCHÄFFER, *Pharm.Acta Helvetiae*, 1926, 1, 9
- (187) P. YATES, G.F. FIELD, *J.Am.Chem.Soc.*, 1960, 82, 5764
- (188) B.S. GIDVANI, *J.Chem.Soc.* 1944, 306
- (189) G. WOLFF, *Thèse Doctorat*, Paris 1964

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Chapitre I. LES COCHENILLES ET LA SECRETION DES CIRES	
I. Caractères généraux et classification des cochenilles.	2
II. Les sécrétions des cochenilles : soies, laques et cires.....	4
III. Intérêt économique des cochenilles.....	10
Chapitre II. LA COMPOSITION DES CIRES NATURELLES	
I. Méthodes d'étude des cires.....	13
A. La chimie des cires jusque vers 1950	
B. Etat actuel de la chimie des cires	
II. Etude de la cire d'abeille.....	24
Chapitre III. TECHNIQUES UTILISEES	
I. Techniques chromatographiques.....	29
II. Techniques diverses.....	31
Chapitre IV. ETUDE DE LA CIRE DE GASCARDIA MADAGASCARIENSIS.	33
I. Extraction et fractionnement des cires.	
A. Résultats obtenus.....	36
B. Description des expériences.....	41
II. Etude des Hydrocarbures.	
A. Résultats obtenus.....	44
B. Description des expériences.....	47
III. Etude des alcools.	
A. Résultats obtenus.....	50
B. Description des expériences.....	55
IV. Etude des acides non hydroxylés	
A. Résultats obtenus.....	60
B. Description des expériences.....	66
V. Etude des acides hydroxylés.	
A. Résultats obtenus.....	70
B. Description des expériences.....	74

VI. Composition de la cire.

A. Résultats obtenus.	88
B. Description des expériences.	92

Chapitre V. ETUDE DES CIRES DE DIVERS COCCIDES

A. Résultats obtenus.	99
1. Les cires de <u>Laccifer lacca</u> et <u>Ceroplastes ceriferus</u>	100
2. Les cires de <u>Icerya purchasi</u> , <u>Ceroplastes rusci</u> , <u>Pulvinaria floccifera</u> et <u>Quadraspidiotus perniciosus</u>	103
B. Description des expériences.	105

CONCLUSIONS	114
-------------------	-----

SPECTRES INFRA-ROUGE

BIBLIOGRAPHIE.	117
---------------------	-----

Figure 2 - Spectre infra-rouge de la fraction I des alcools de Gascardia madagascariensis (Nujol).

Figure 4 - Spectre infra-rouge de la fraction I des esters méthyliques des acides de Gascardia madagascariensis (Nujol).

Figure 5 - Spectre infra-rouge de la fraction II des esters méthyliques des acides de Gascardia madagascariensis (Nujol).

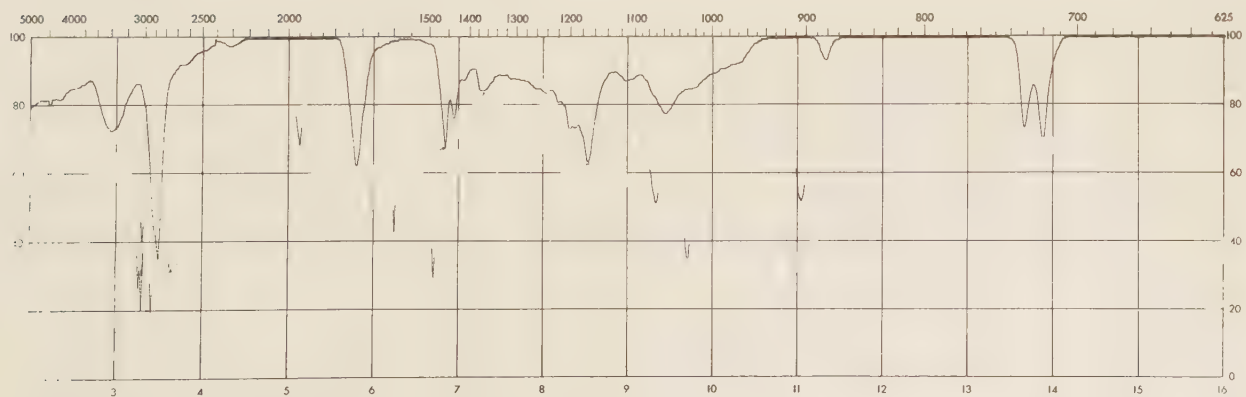
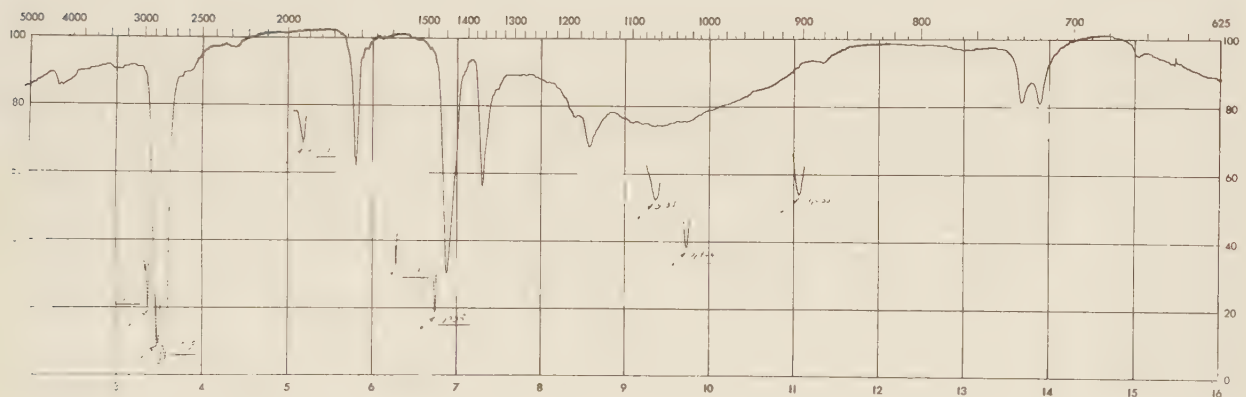
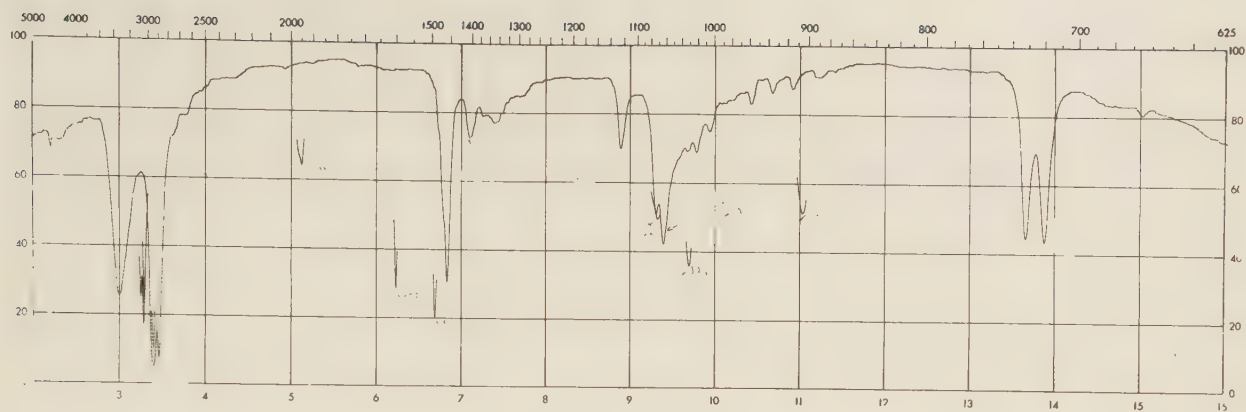


Figure 7 - Spectre infra-rouge de la fraction I des esters méthyliques de Gascardia madagascariensis après saponification. (Nujol).

Figure 8 - Spectre infra-rouge des hydroxyesters méthyliques de Gascardia madagascariensis après acétylation. (Nujol).

Figure 10 - Spectre infra-rouge du diol obtenu après réduction par Li Al H_4 des hydroxyesters méthyliques de Gascardia madagascariensis. (Nujol).

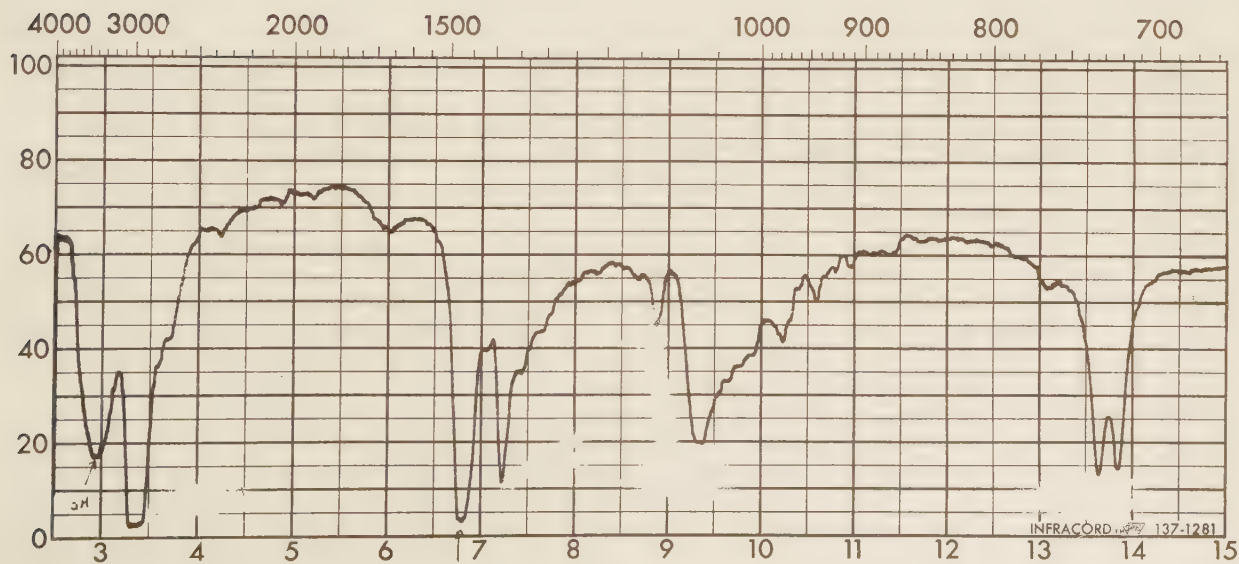
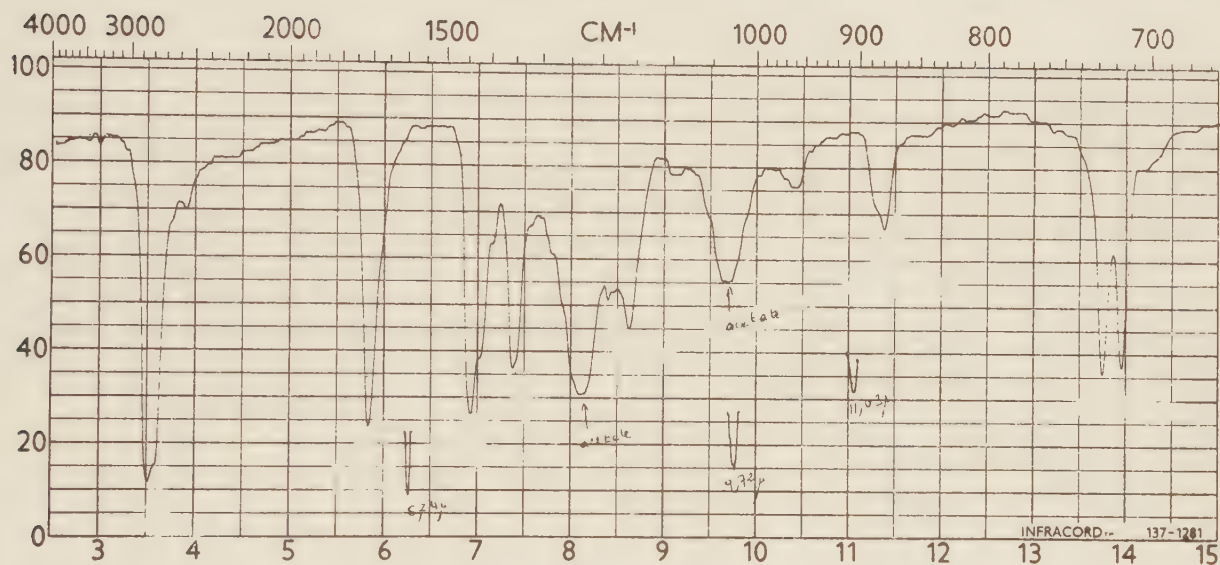
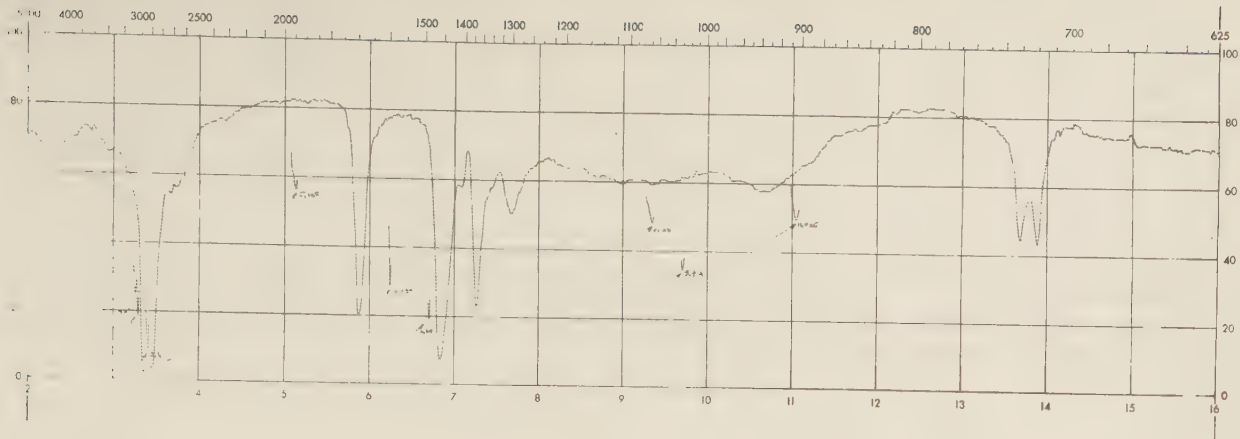


Figure 11 - Spectre infra-rouge des alcanes obtenus après réduction des hydroxyesters de Gascardia madagascariensis par Li Al H_4 et $\text{IH} + \text{P}$. (Nujol).

Figure 13 - Spectre infra-rouge de hydroxyesters méthyliques de Gascardia madagascariensis après saponification. (Nujol).

Figure 14 - Spectre infra-rouge de l'ester iodhydrique du diol. (Nujol).

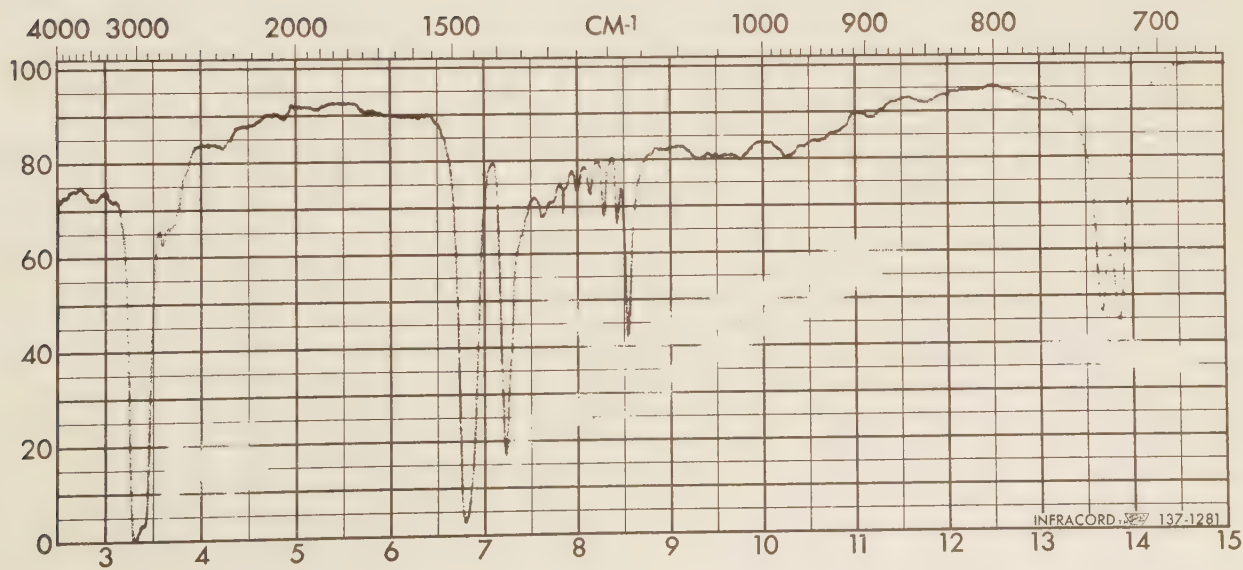
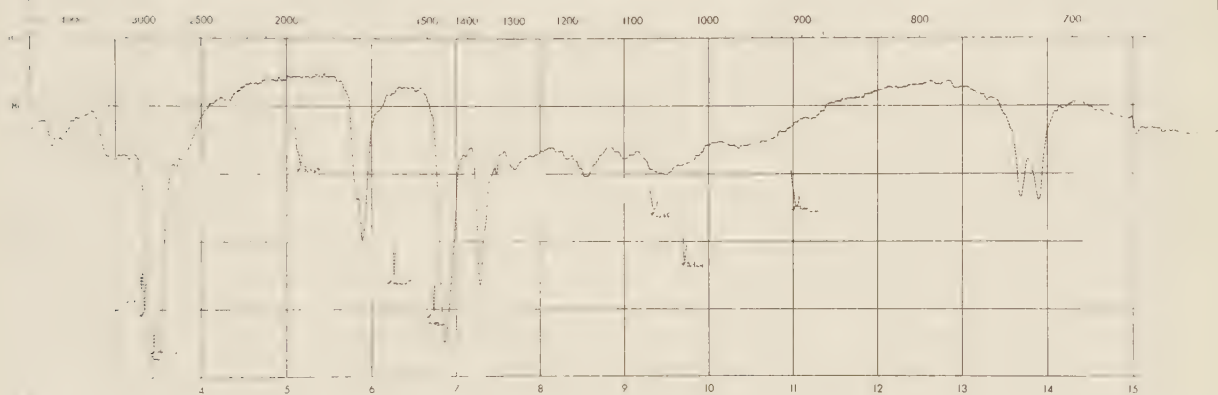
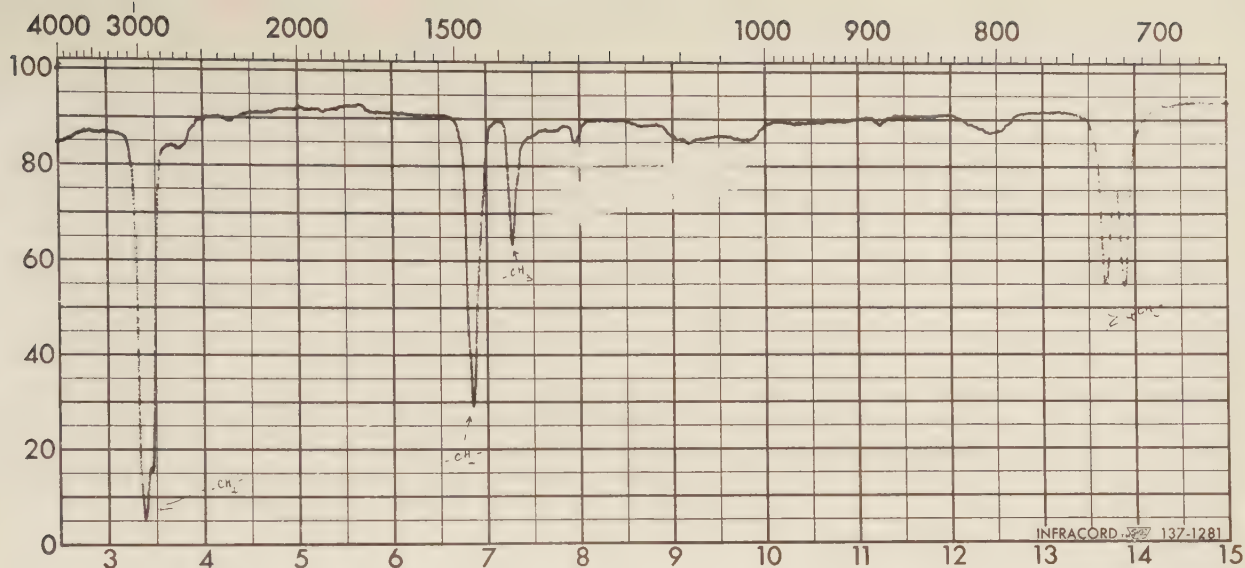
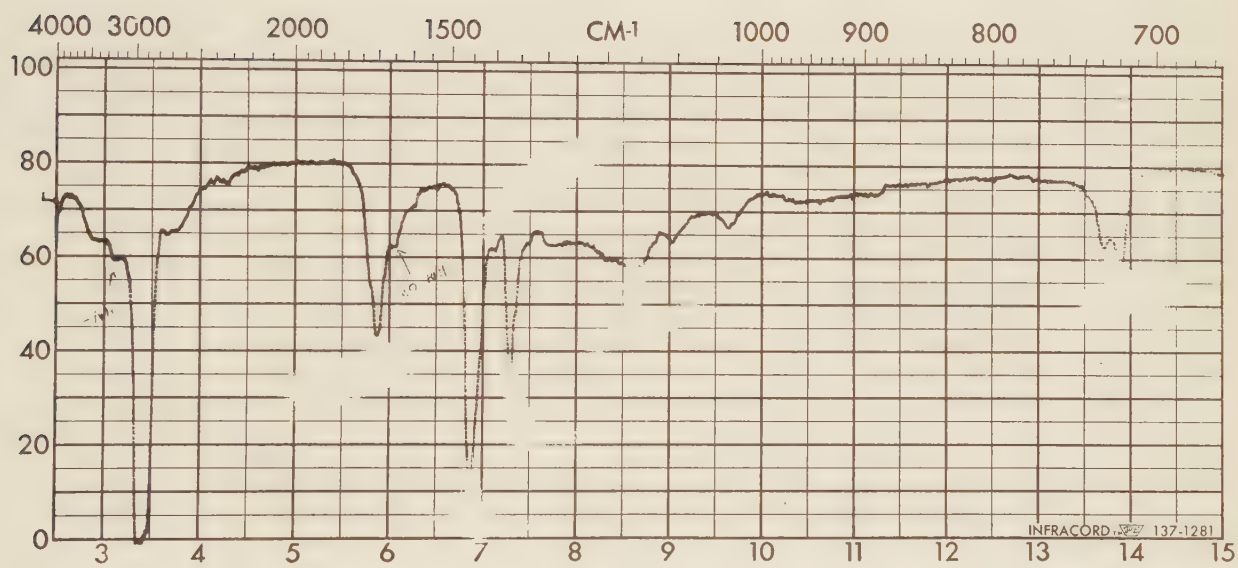
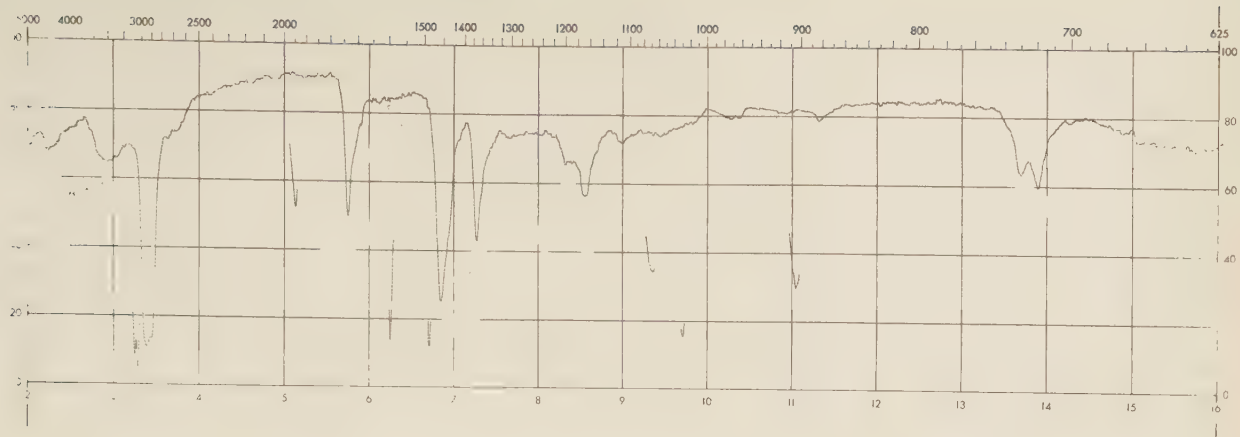


Figure 15 - Spectre infra-rouge de l'oxime obtenue à partir des hydroxyesters de Gascardia madagascariensis (Nujol).

Figure 16 - Spectre infra-rouge de l'amide obtenue à partir des hydroxyesters de Gascardia madagascariensis (Nujol).



DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

SUBSTANCES LIPIDIQUES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES
ISOLEES DES INSECTES

Vu :

Les Membres du Jury :

M. J. CHOPIN
Melle D. GAUTHERON
M. G. MICHEL

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

LYON , le 25 Février 1965

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS

